

**Signalweiterleitung in *Ustilago maydis*:  
Die Kpp4/Fuz7/Kpp2-MAPK-Kaskade  
kontrolliert Pheromonantwort und  
pathogene Entwicklung**

Dissertation

zur

Erlangung des Doktorgrades  
der Naturwissenschaften  
(Dr. rer. nat.)

dem Fachbereich Biologie  
der Philipps-Universität Marburg  
vorgelegt von

Philip Müller  
aus Heidelberg

Marburg/Lahn 2003



Die Untersuchungen zur vorliegenden Arbeit wurden unter der Betreuung von Frau Prof. Dr. Regine Kahmann von November 1998 bis Ende August 2000 in München am Institut für Genetik und Mikrobiologie, sowie von Anfang September 2001 bis August 2002 in Marburg am Max-Planck-Institut für terrestrische Mikrobiologie in der Abteilung für Organismische Interaktionen durchgeführt.

vom Fachbereich Biologie

der Philipps-Universität Marburg als Dissertation

angenommen am: \_\_\_\_\_

Erstgutachter: Frau Prof. Dr. Regine Kahmann

Zweitgutachter: Herr Prof. Dr. Michael Bölker

Tag der mündlichen Prüfung am: \_\_\_\_\_

Teile dieser Arbeit wurden/werden in folgenden Artikeln veröffentlicht:

**Müller, P., Aichinger, C., Feldbrügge, M. und Kahmann, R.** (1999) The MAP kinase Kpp2 regulates mating and pathogenic development in *Ustilago maydis*. *Mol Microbiol*, **34**, 1007-1017.

**Müller, P., Katzenberger, J. D., Loubradou, G. und Kahmann, R.** (2003) The Guanyl Nucleotide Exchange Factor Ssl2 and Ras2 regulate filamentous growth in *Ustilago maydis*. *Eukaryot Cell*, im Druck.

**Brachmann, A., Schirawski, J., Müller, P. und Kahmann, R.** (2003) An unusual MAP kinase is required for efficient penetration of the plant surface by *U. maydis*. *EMBO J*, **22**, im Druck.

**Müller, P., Weinzierl, G., Brachmann, A., Feldbrügge, M. und Kahmann, R.** (2003) Both mating and pathogenic development of the smut fungus *Ustilago maydis* are regulated by one MAP kinase cascade. Eingereicht.

**Müller, P., Leibbrandt, A., Cubasch, S., Teunissen, H., Aichinger, C. und Kahmann, R.** (2003) The G $\beta$ -subunit encoding gene *bpp1* controls cAMP signalling in *Ustilago maydis*. Eingereicht.

*Wer kann was Dummes, wer was Kluges denken,  
das nicht die Vorwelt schon gedacht*

J. W. von Goethe (1749-1832)



## **Erklärung**

Ich versichere, dass ich meine Dissertation mit dem Titel “Signalweiterleitung in *Ustilago maydis*: Die Kpp4/Fuz7/Kpp2-MAPK-Kaskade kontrolliert Pheromonantwort und pathogene Entwicklung” selbständig, ohne unerlaubte Hilfe angefertigt und mich dabei keiner anderen als der von mir ausdrücklich bezeichneten Quellen und Hilfen bedient habe.

Die Dissertation wurde in der jetzigen oder einer ähnlichen Form noch bei keiner anderen Hochschule eingereicht und hat noch keinen sonstigen Prüfungszwecken gedient.

---

(Ort, Datum)

---

Philip Müller



## Zusammenfassung

Die pathogene Entwicklung von *U. maydis*, dem Erreger des Maisbeulenbrandes, wird durch die Fusion von zwei haploiden Sporidien eingeleitet. Das entstehende Dikaryon ist in der Lage, die Maispflanze zu infizieren. Diese Prozesse werden durch die beiden Paarungstyploci *a* und *b* kontrolliert. Der biallelische *a*-Locus steuert über ein Pheromon-Pheromonrezeptorsystem die Zell-Zell-Erkennung und die anschließende Zellfusion. Der multiallelische *b*-Locus kodiert für zwei Homeodomänenproteine, bW und bE, die nur in bestimmten Kombinationen die weiteren Entwicklungsschritte einleiten können. Während des Paarungsprozesses induziert das Pheromonsignal die Ausbildung von Konjugationshyphen sowie die Transkription der Gene im *a*- und *b*-Locus. Verantwortlich hierfür ist der Transkriptionsfaktor Prf1, der neben putativen PKA- mehrere MAPK-Phosphorylierungsstellen trägt, über die die Aktivität des Proteins posttranskriptionell reguliert wird. In früheren Arbeiten wurden der MAP-Kinase Kpp2 sowie der MAPK-Kinase Fuz7 eine Rolle während der Pheromonantwort zugeschrieben – beide Komponenten konnten aber nicht in eine Kaskade eingeordnet werden.

In dieser Arbeit wurde mit Kpp4 eine MAPKK-Kinase charakterisiert, die für die Pheromonantwort benötigt wird. Mittels Epistasis-Analysen und biochemischen Untersuchungen konnten Kpp4, Fuz7 und Kpp2 in ein MAPK-Modul eingeordnet werden, das an der Weiterleitung des Pheromonsignals beteiligt ist. Ein Funktionsverlust in diesem Modul führte zum Ausfall der Konjugationshyphenbildung und der Pheromon-induzierten Transkription der *b*-Gene. Die Expression von konstitutiv-aktiven Fuz7-Varianten stimulierte hingegen die Ausbildung von Konjugationshyphen-ähnlichen Filamenten sowie die Transkription der *a*- und *b*-Gene. Kpp2 wurde nach Pheromonstimulation aktiviert und konnte Prf1 *in vitro* phosphorylieren. Interessanterweise wurde Prf1 nicht für die Ausbildung der Konjugationshyphen benötigt – die Pheromonsignalweiterleitung verzweigt sich somit unterhalb von Kpp2. Neben dem Kpp4/Fuz7/Kpp2-Modul ist der cAMP-Signalweg an der Pheromonsignalweiterleitung beteiligt und kontrolliert die Pheromon-abhängige *a*-Genexpression, sowie die Zell-Zellfusion. Damit wird in *U. maydis* das Pheromonsignal im Gegensatz zur Situation in verwandten Organismen über zwei Signalweiterleitungssysteme übertragen.

Das Kpp4/Fuz7/Kpp2-Modul ist außerdem für die pathogene Entwicklung von *U. maydis* essenziell, auch in artifiziellen Situationen, in denen eine Zellfusion nicht erforderlich ist. Nähere Untersuchungen zeigten, dass die Integrität des Moduls für die Ausbildung von Infektionsstrukturen benötigt wird, über die die Penetration der Pflanzenoberfläche erfolgt. Während dieser frühen Phase der Infektion haben die beiden eng verwandten MAP-Kinasen Kpp2 und Kpp6 redundante Funktionen. Überraschenderweise ist für eine erfolgreiche Infektion die Phosphorylierbarkeit von Kpp2, nicht aber seine enzymatische Aktivität entscheidend.

## Abkürzungen und Fachbegriffe

aa	Aminosäuren	NLS	„nuclear localization sequence“
Amp	Ampicillin	NES	„nuclear export sequence“
Ara	Arabinose	OD <sub>600</sub>	Optische Dichte bei 600 nm
bp	Basenpaar(e)	ORF	„open reading frame“
C-terminal	carboxyterminal	PAA	Polyacrylamid
Cbx	Carboxin	PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
CM	„complete medium“	PC	Phenol/Chloroform
cpm	„counts per minute“	PCR	„polymerase chain reaction“
DAPI	4',6'-Diamidino-2-Phenylindol	PD	„potato dextrose“
DIC	„differential interference contrast“	PEG	Polyethylenglycol
DMF	Dimethylformamid	Phleo	Phleomycin
DMSO	Dimethylsulfoxid	PIPES	Piperazine N-N'-bis (2-Ethan-sulphonat)
DTT	Dithiothreitol	PKA	„protein kinase A“
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure	PRE	„pheromone response element“
EGFP	„enhanced green fluorescent protein“	RA	„ras-association“
EGTA	Ethylenglycoltetraessigsäure	RT	„reverse transcription“ oder Raumtemperatur
ERK	„extracellular regulated kinase“	SAM	„sterile-alpha-motif“
GAP	„GTPase activating protein“	SDS	Natriumdodecylsulfat
GEF	„guanine nucleotide exchange factor“	TAE	Tris-Acetat + Na <sub>2</sub> -EDTA
GFP	„green fluorescent protein“	TBE	Tris-Borat + Na <sub>2</sub> -EDTA
Glc	Glucose	TE	Tris-Cl + Na <sub>2</sub> -EDTA
H <sub>2</sub> O <sub>bid.</sub>	zweifach destilliertes Wasser	TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylen-diamin
HMG	„high mobility group“	Tris	Trishydroxymethylamino-methan
Hyg	Hygromycin	U	Unit (Enzymaktivitätseinheit)
IPTG	Isopropyl-β-thiogalacto-pyranosid	UARS	„ <i>U. maydis</i> autonomously replicating sequence“
kb	Kilobasenpaar	UAS	„upstream activating sequence“
MAPK	„mitogen activated protein kinase“	Ü/N	über Nacht
MAPKK	MAPK-Kinase	Upm	Umdrehungen pro Minute
MAPKKK	MAPKK-Kinase	UV	ultraviolettes Licht
MOPS	3-(N-Morpholino)propan-sulphonat	wt	Wildtyp
N-terminal	aminoterminal		
Nat	Nourseothricin		sowie Aminosäuren im Ein-Buchstaben-Code

# Inhaltsverzeichnis

<b>ZUSAMMENFASSUNG .....</b>	<b>I</b>
<b>ABKÜRZUNGEN UND FACHBEGRIFFE .....</b>	<b>II</b>
<b>INHALTSVERZEICHNIS.....</b>	<b>III</b>
<b>1 EINLEITUNG.....</b>	<b>1</b>
1.1 SIGNALPERZEPTION UND SIGNALWEITERLEITUNG SIND KONSERVIERTE PATHOGENITÄTSMechanismen .....	1
1.1.1 Die Hauptkomponenten der MAPK- und cAMP-Kaskaden.....	3
1.1.2 MAPK- und cAMP-Signalweiterleitung in der Bäckerhefe <i>S. cerevisiae</i> .....	4
1.2 <i>USTILAGO MAYDIS</i> ALS MODELLORGANISMUS FÜR PATHOGENE PILZE .....	8
1.3 DER LEBENSZYKLUS VON <i>U. MAYDIS</i> .....	9
1.3.1 Der Infektionsprozess .....	9
1.3.2 Der Lebenszyklus unterliegt der Kontrolle der Paarungstyploci .....	11
1.4 DIE PHEROMONANTWORT .....	13
1.4.1 Prf1 ist der zentrale Regulator der Pheromonantwort .....	14
1.4.2 Signalweiterleitung während der Zell-Zell-Erkennung.....	14
1.4.3 Signalweiterleitung während der pathogenen Entwicklung.....	17
1.5 FRAGESTELLUNG DIESER ARBEIT .....	18
<b>2 ERGEBNISSE.....</b>	<b>19</b>
2.1 GENETISCHE CHARAKTERISIERUNG DER PHEROMON-MAPK-KASKADE .....	19
2.1.1 <i>kpp4</i> kodiert für eine MAPKKK .....	19
2.1.2 Der Verlust von <i>kpp4</i> beeinträchtigt $\alpha$ -abhängige Prä- und Postfusionsprozesse.....	22
2.1.3 Epistasis-Analyse zwischen <i>kpp4</i> , <i>fuz7</i> , <i>kpp2</i> und <i>prf1</i> .....	24
2.1.4 Analyse der Pheromon-abhängigen Genexpression in $\Delta kpp4$ -, $\Delta fuz7$ - und $\Delta kpp2$ -1-Mutanten.....	36
2.2 BIOCHEMISCHE ANALYSE DES KPP4/FUZ7/KPP2-MODULS .....	41
2.2.1 Kpp2 wird durch Pheromonstimulus aktiviert und kann Prf1 <i>in vitro</i> phosphorylieren.....	41
2.2.2 Die Expression von <i>fuz7DD</i> erhöht die Kinaseaktivität von Kpp2 .....	42
2.2.3 Kpp2 interagiert mit Fuz7 und Prf1 .....	43
2.2.4 Interaktionen zwischen den bekannten MAPK-Modul Komponenten.....	45
2.2.5 Pheromon sowie <i>kpp4-2</i> beeinflussen die subzelluläre Lokalisation von Kpp2 .....	47
2.3 DAS KPP4/FUZ7/KPP2-MODUL IST FÜR DIE PATHOGENE ENTWICKLUNG ENTSCHEIDEND .....	48
2.3.1 <i>kpp4</i> - und <i>fuz7</i> -Deletionsmutanten sind nicht in der Lage, Pflanzen zu infizieren.....	48
2.3.2 Die Expression von <i>kpp2AEF</i> führt zum Pathogenitätsverlust .....	50
2.3.3 Die Integrität des Kpp4/Fuz7/Kpp2-Moduls ist für die Ausbildung der Infektionsstrukturen essenziell.....	51

2.4 WELCHE KOMPONENTEN SIND AN DER AKTIVIERUNG DER KPP4/FUZ7/KPP2-MAPK-KASKADE BETEILIGT? ....	52
2.4.1 Weder Gpa3 noch Bpp1 agieren oberhalb der Kpp4/Fuz7/Kpp2-MAPK-Kaskade .....	52
2.4.2 Die Ras-Interaktionsdomäne spielt für die Funktion von Kpp4 eine wichtige Rolle .....	53
2.4.3 Die Expression des dominant-aktiven <i>rasI<sub>Q67L</sub></i> stimuliert die Pheromongenexpression .....	56
2.5 ANALYSE DER KOMMUNIKATION ZWISCHEN DER MAPK-KASKADE UND DEM CAMP-SIGNALWEG.....	57
2.5.1 Ein aktivierter cAMP-Signalweg beeinflusst die Zellmorphologie unabhängig von Kpp2 .....	57
2.5.2 Die Zell-Zellfusion unterliegt der Kontrolle des cAMP-Signalwegs und der MAPK-Kaskade .....	59
<b>3 DISKUSSION.....</b>	<b>61</b>
3.1 DIE REGULATION DER PHEROMONANTWORT IN <i>U. MAYDIS</i> DURCH DIE KPP4/FUZ7/KPP2-MAPK-KASKADE.....	61
3.1.1 Die Kpp4/Fuz7/Kpp2-Kaskade .....	61
3.1.2 Das Kpp4/Fuz7/Kpp2-MAPK-Modul ist an der Übermittlung des Pheromonsignals beteiligt .....	63
3.1.3 Die Kpp4/Fuz7/Kpp2-MAPK-Kaskade reguliert die Expression der <i>a</i> - und <i>b</i> -Gene durch zwei unterschiedliche Mechanismen .....	65
3.1.4 Während der Pheromonantwort wird die Aktivität des Transkriptionsfaktors Prf1 durch Kpp2 und Adr1 reguliert .....	66
3.1.5 Die MAPK Kpp2 hat während der Pheromonantwort eine Kinase-unabhängige Funktion .....	68
3.1.6 Die Kpp4/Fuz7/Kpp2-MAPK-Kaskade reguliert die Konjugations- hyphenbildung unabhängig von Prf1 und der cAMP-Signalkaskade .....	69
3.2 DIE REGULATION DER PATHOGENEN ENTWICKLUNG DURCH DIE KPP4/FUZ7/KPP2-MAPK-KASKADE .....	71
3.2.1 Die Signalweiterleitung über das Kpp4/Fuz7/Kpp2-MAPK-Modul entscheidet über die pathogene Entwicklung .....	71
3.2.2 Die MAPK Kpp2 und Kpp6 haben während der pathogenen Entwicklung redundante und spezifische Funktionen.....	72
3.3 DIE REGULATION DER MAPKKK KPP4 .....	73
3.4 MODELLVORSTELLUNG DER MAPK-SIGNALWEITERLEITUNG IN <i>U. MAYDIS</i> .....	76
<b>4 MATERIAL UND METHODEN .....</b>	<b>81</b>
4.1 MATERIALIEN UND BEZUGSQUELLEN .....	81
4.1.1 Medien, Lösungen, Enzyme und Kits .....	81
4.1.2 Oligonukleotide .....	83
4.1.3 Stämme.....	85
4.1.4 Ausgangsplasmide .....	93
4.1.5 In dieser Arbeit hergestellte Plasmide .....	95
4.1.6 Sequenzierungsstrategie von <i>kpp4</i> .....	102
4.1.7 Isolierung der <i>kpp4</i> -cDNA-Fragmente .....	103
4.2 MIKROBIOLOGISCHE, ZELLBIOLOGISCHE UND GENETISCHE METHODE .....	103
4.2.1 <i>Escherichia coli</i> .....	103
4.2.2 <i>Saccharomyces cerevisiae</i> .....	104
4.2.3 <i>Ustilago maydis</i> .....	106

4.3 MOLEKULARBIOLOGISCHE STANDARDMETHODEN .....	109
4.3.1 Isolierung von Nukleinsäuren .....	109
4.3.2 Auftrennung und Nachweis von Nukleinsäuren .....	111
4.3.2 Sequenz- und Strukturanalyse .....	112
4.3.3 PCR-Techniken.....	113
4.4 BIOCHEMISCHE METHODEN.....	114
4.4.1 SDS-Gelelektrophorese von Proteinen .....	114
4.4.2 Transfer von Proteinen (Western-Blot) .....	114
4.4.3 Nachweis von immobilisierten Proteinen .....	115
4.4.4 Überexpression und Reinigung von GST-Fusionsproteinen aus <i>E. coli</i> .....	115
4.4.5 Isolierung von Proteinen aus <i>S. cerevisiae</i> .....	116
4.4.6 Isolierung von Proteinen aus <i>U. maydis</i> .....	116
4.4.7 GST-Pulldown-Assay .....	116
4.4.8 Kinaseaktivitätstest .....	116
<b>5 LITERATURVERZEICHNIS.....</b>	<b>119</b>





# 1 Einleitung

In der Mitte des neunzehnten Jahrhunderts führten in Irland dramatische Hungersnöte in Verbindung mit extrem kalt-feuchten Wintern nicht nur zu unzähligen Toten, sondern auch zur Emigration von vielen zehntausenden Menschen. Die Kartoffelfäule hatte in zwei Jahren hintereinander große Teile der Kartoffelernte vernichtet, und damit mangelte es vielen irischen Familien an ihrem Hauptnahrungsmittel. Es folgten , über Jahrzehnte andauernde Emigrationen in die westliche Hemisphäre, die weit reichende soziale und politische Auswirkungen nach sich zogen (Hulder, 1998).

Auch heutzutage haben Pflanzenkrankheiten in Folge des Bevölkerungswachstums und der damit verbundenen Intensivierung des Getreideanbaus einen enormen wirtschaftlichen, sozialen und politischen Stellenwert. Durch Krankheitsepidemien ausgelöste Ertragsverluste sind schwer zu beziffern, werden aber weltweit auf bis zu 40 % der Erträge geschätzt. Von den auftretenden Pflanzenkrankheiten werden ca. 83 % durch Pilze, die übrigen durch Viren, Viroide, Bakterien oder Nematoden verursacht (Müller und Loeffler, 1992). Damit stellen Pilze die größte Gruppe der Pflanzenschädlinge dar, und ihr jährlich verursachter Schaden wird auf 8 % bis 25 % geschätzt (Börner, 1997; Weber, 1993). In den letzten Jahrzehnten haben auch humanpathogene Pilze als opportunistische Pathogene erheblich an Bedeutung gewonnen. Es werden vermehrt nosokomiale Infektionen beobachtet, wobei zumeist immunsupprimierte Patienten, wie Transplantations-, Chemotherapiepatienten, sowie HIV-infizierte Personen von diesen Krankheitserregern betroffen sind (Guarro *et al.*, 1999).

Das Verständnis der pilzlichen Infektionen steht somit im besonderen Interesse der Wissenschaft sowie der Pharma- und Pflanzenschutzforschung. Die dabei gewonnenen Erkenntnisse sollten helfen, Ansätze zur Therapie, Bekämpfung und Vermeidung von Pilzinfektionen weiterzuentwickeln und zu verbessern.

## 1.1 Signalperzeption und Signalweiterleitung sind konservierte Pathogenitätsmechanismen

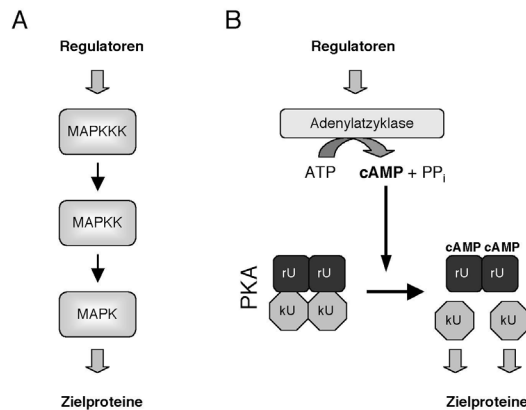
Die immense Verschiedenheit an Organismen, die von phyto- sowie humanpathogenen Pilze infiziert werden, und die damit verbundene Adaption an den Wirt, erschwert den Blick auf konservierte Mechanismen, die allen pilzlichen Infektionen zu Grunde liegen könnten. Die Unterteilung des Infektionsprozesses in eine zeitliche Abfolge von Ereignissen erleichtert aber den Vergleich der Infektionsstrategien. So beinhalten Infektionen typischerweise folgende Prozesse: Erkennung des Wirtes, Anheftung an das zu infizierende Gewebe, Eindringen und Kolonialisierung des Wirtsgewebes. Betrachtet man diese Prozesse im Detail, so werden pathogen- und wirtsspezifische, aber auch konservierte Mechanismen deutlich, die für die Pathogenität der Krankheitserreger von großer Bedeutung sind.

Phytopathogene Pilze haben unterschiedliche Strategien, sich an die Pflanzenoberfläche anzuheften, im Allgemeinen scheinen dabei aber Oberflächenproteine eine Rolle zu spielen (Tucker und Talbot, 2001). Auf der Pflanze bilden die Pilzzellen Infektionshyphen, die direkt durch Stellen der Verwundung oder Spaltöffnungen eindringen, oder spezialisierte Infektionsstrukturen aus, um die Pflanzenepidermis penetrieren zu können (Tucker und Talbot, 2001). Diese Differenzierung kann durch eine Vielzahl von unterschiedlichen Signalen ausgelöst werden. So spielen unter anderem spezifische Pflanzensignale sowie physikalische Eigenschaften wie Oberflächentopographie, -härte und -hydrophobizität eine Rolle (Tucker und Talbot, 2001). Man nimmt an, dass der Pilz während dieser Prozesse seinen Wirt erkennt. Von humanpathogenen Pilzen wie z.B. *Candida albicans* und *Cryptococcus neoformans* ist bekannt, dass membranständige Proteine (Adhesine) die Affinität zu Endothel- sowie Epithelzellen und damit wahrscheinlich auch die Wirtserkennung vermitteln (Herman und Calderone, 2002; Lengeler und Heitman, 2002). Im Gegensatz zu phytopathogenen Pilzen bilden humanpathogene Pilze keine prägnanten Infektionsstrukturen aus, und es können sowohl Hyphen, als auch hefeartige Formen das pathogene Agens sein. Die Lunge kann durch die hefeartig wachsenden Zellen von *C. neoformans* oder durch die Hyphen von *Aspergillus fumigatus* befallen werden. *C. albicans* hingegen benötigt die Fähigkeit, zwischen hefeartigem und filamentösem Wachstum wechseln zu können, um pathogen zu sein (Herman und Calderone, 2002; Lo *et al.*, 1997). Nach erfolgreichem Eindringen ist der nächste Schritt die Besiedelung des Wirtsgewebes. An der Mazeration des Wirtsgewebes sind vermutlich sowohl in phyto- als auch humanpathogenen Pilzen extrazellulärer Enzyme beteiligt. Die Produktion von Kutinasen, Cellulasen und pektinolytischen Enzymen konnte in vielen phytopathogenen Pilzen nachgewiesen werden (Schäfer, 1994), während humanpathogene Pilze Phospholipasen, Ureasen und Proteasen exprimieren (Herman und Calderone, 2002; Lengeler und Heitman, 2002).

Die verschiedenen Schritte der Infektionen beinhalten also meist tief greifende phänotypische Veränderungen, die es dem Pilz ermöglichen, sich seiner Wirtsumgebung anzupassen und seine pathogene Entwicklung zu durchlaufen. Die Koordination dieser Prozesse wird durch die Integration der verschiedenen Umweltsignale mit intrazellulären Informationen ermöglicht. Somit spielen Perzeption und deren Weiterleitung von Umweltsignalen eine zentrale Rolle. Die Forschungen der letzten 10 Jahre haben zunehmend aufgedeckt, dass insbesondere zwei Signalweiterleitungsprinzipien an der Regulation der pathogenen Entwicklung beteiligt sind: MAPK-Module (*mitogen-activated-protein kinase*) und cAMP-Signalkaskaden (*cyclic adenosine monophosphate*) (Borges-Walmsley und Walmsley, 2000; D'Souza und Heitman, 2001; Kronstad, 1997; Lengeler *et al.*, 2000; Xu, 2000).

### 1.1.1 Die Hauptkomponenten der MAPK- und cAMP-Kaskaden

MAPK-Module und cAMP-Signalwege sind in allen Eukaryoten hoch konserviert und haben jeweils drei Hauptkomponenten (Chen *et al.*, 2001; Pearson *et al.*, 2001). MAPK-Module bestehen aus drei hierarchisch agierenden Kinasen, einer MAPKK-Kinase (MAPKKK), einer



**Abbildung 1: Die Hauptkomponenten der MAPK-Module (A) und cAMP-Signalwege (B).** Verwendete Abkürzungen in B: PP<sub>i</sub>: Pyrophosphat; rU: regulatorische Untereinheit; kU: katalytische Untereinheit. Nähere Erläuterungen siehe Text.

MAPK-Kinase (MAPKK) und einer MAP-Kinase (Abb. 1A). Das zu übermittelnde Signal wird dabei von der MAPKKK auf die MAPKK durch Phosphorylierung an zwei konservierten Serin- und/oder Threonin-Aminosäureresten übertragen. Die so aktivierte MAPKK phosphoryliert als dualspezifische Kinase die MAPK an einem Threonin- und einem Tyrosin-Aminosäurerest, die beide im so genannten T-Loop oder Aktivierungssegment der MAPK zu finden sind. Zuletzt übertragen die MAP-Kinasen das zu übermittelnde Signal auf Zielproteine, die an Serin- oder Threonin-

Aminosäureresten des Konsensusmotivs PxS/TP phosphoryliert werden (Clark-Lewis *et al.*, 1991).

Der cAMP-Signalweg arbeitet mit dem sekundären Botenstoff cAMP und besteht aus drei Hauptkomponenten (Johnson *et al.*, 2001; Taylor und Buechler, 1990). Das von der Adenylatzyklase nach Stimulierung gebildete cAMP kontrolliert die Aktivität der cAMP-abhängigen Proteinkinase (PKA), die als inaktives Holoenzym aus zwei regulatorischen und zwei katalytischen Untereinheiten besteht (Abb. 1B). Die kooperative Bindung von cAMP-Molekülen an die hoch affinen cAMP-Bindestellen der regulatorischen Untereinheiten führt zur Dissoziation der katalytischen Untereinheiten. Die regulatorischen Untereinheiten sind damit cAMP-Rezeptoren und Inhibitoren der katalytischen Untereinheiten. Letztere phosphorylieren ihre Zielproteine an Serin- oder Threonin-Aminosäureresten des Konsensusmotivs RRxS/T (Johnson *et al.*, 2001; Taylor und Buechler, 1990).

Das Verständnis der MAPK-Module und cAMP-Signalwege in pathogenen Pilzen ist noch recht begrenzt. Einige Organismen dienen aufgrund ihrer Zugänglichkeit für genetische und molekularbiologische Methoden als Modelle zum Verständnis der Signalweiterleitungsmechanismen. In diesen Modellorganismen sind Gene identifiziert worden, die für Komponenten dieser Signalwege kodieren und für die Pathogenität dieser Pilze notwendig sind (Tabelle 1). Insgesamt sind aber die Aufgaben und das Zusammenspiel der jeweiligen Signalwege noch

ungenügend verstanden. In diesem Zusammenhang kommt der Bäckerhefe *Saccharomyces cerevisiae* eine besondere Rolle zu, da in diesem saprophytischen Pilz die Prinzipien und Funktionen der MAPK-Kaskaden, sowie des cAMP-Signalwegs detailliert analysiert wurden. Die jeweiligen Komponenten dieser Kaskaden weisen hohe Ähnlichkeit zu denen in pathogenen Pilzen auf (Tabelle 1). Daher wird im Folgenden ein kurzer Überblick über die Grundprinzipien der MAPK- und cAMP-vermittelten Signalweiterleitung in *S. cerevisiae* gegeben.

**Tabelle 1: Auswahl an bekannten MAPK- und cAMP-Signalwegkomponenten pathogener Pilze**

Organismus und Genname	Komponente	Homologes Gen in <i>S. cerevisiae</i>	Pathogenität der Nullmutanten	Referenz
<b><i>Candida albicans</i></b>				
<i>CEK1</i>	MAPK	<i>FUS3, KSS1</i>	reduziert	(Csank <i>et al.</i> , 1998)
<i>MKC1</i>	MAPK	<i>SLT2</i>	reduziert	(Diez-Orejas <i>et al.</i> , 1997)
<i>CaHOG1</i>	MAPK	<i>HOG1</i>	reduziert	(Alonso-Monge <i>et al.</i> , 1999)
<i>TPK2</i>	PKA kU <sup>1</sup>	<i>TPK</i>	schwach reduziert	(Sonneborn <i>et al.</i> , 2000)
<i>CaCDC35</i>	Adenylatzyklase	<i>CYC1</i>	apathogen	(Rocha <i>et al.</i> , 2001)
<b><i>Cryptococcus neoformans</i></b>				
<i>PKA1</i>	PKA kU <sup>1</sup>	<i>TPK</i>	apathogen	(D'Souza <i>et al.</i> , 2001)
<i>CAC1</i>	Adenylatzyklase	<i>CYC1</i>	apathogen	(Alspaugh <i>et al.</i> , 2002)
<b><i>Magnaporthe grisea</i></b>				
<i>PMK1</i>	MAPK	<i>FUS3, KSS1</i>	apathogen	(Xu und Hamer, 1996)
<i>MPS1</i>	MAPK	<i>SLT2</i>	apathogen	(Xu <i>et al.</i> , 1998)
<i>OSM1</i>	MAPK	<i>HOG1</i>	nicht reduziert	(Dixon <i>et al.</i> , 1999)
<i>MAC1</i>	Adenylatzyklase	<i>CYC1</i>	apathogen	(Choi und Dean, 1997)
<i>SUM1</i>	PKA rU <sup>1</sup>	<i>BCY1</i>	apathogen	(Adachi und Hamer, 1998)
<i>CPKA</i>	PKA kU <sup>1</sup>	<i>TPK</i>	apathogen	(Mitchell und Dean, 1995)
<b><i>Ustilago maydis</i></b>				
<i>fuz7</i>	MAPKK	<i>STE7</i>	stark reduziert	(Banuett und Herskowitz, 1994a)
<i>ubc3/kpp2</i>	MAPK	<i>FUS3, KSS1</i>	reduziert	(Müller <i>et al.</i> , 1999)
<i>uac1</i>	Adenylatzyklase	<i>CYC1</i>	apathogen	(Mayorga und Gold, 1999)
<i>ubc1</i>	PKA rU <sup>1</sup>	<i>BCY1</i>	apathogen	(Barrett <i>et al.</i> , 1993)
<i>adr1</i>	PKA kU <sup>1</sup>	<i>TPK</i>	apathogen	(Gold <i>et al.</i> , 1997)
				(Dürrenberger <i>et al.</i> , 1998)

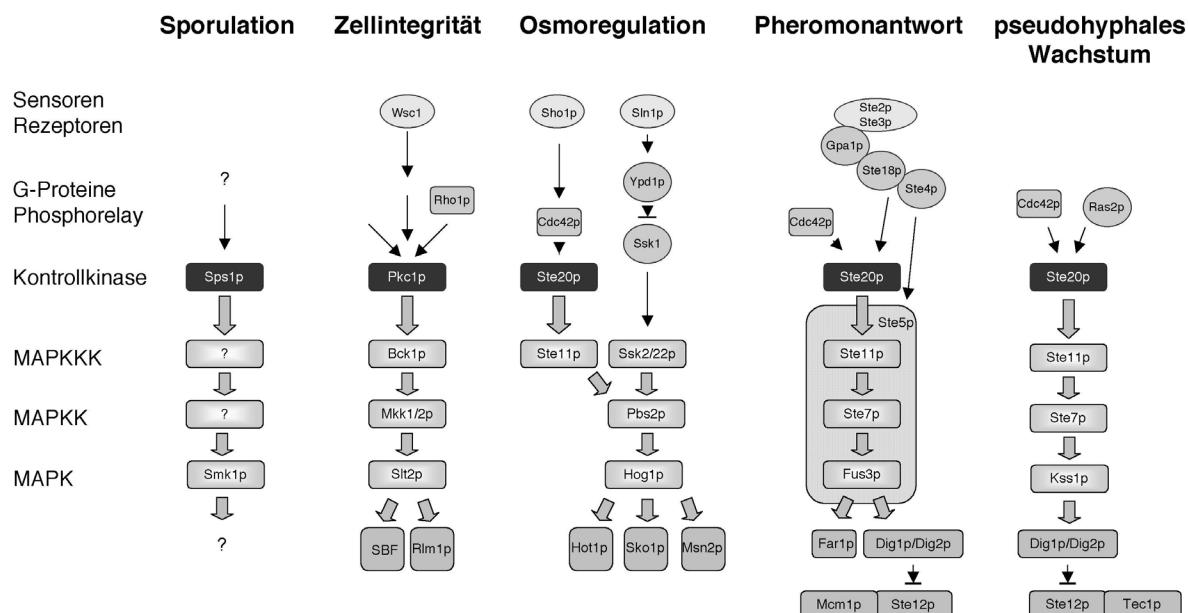
<sup>1</sup>Abkürzungen: kU: katalytische Untereinheit; rU regulatorische Untereinheit

### 1.1.2 MAPK- und cAMP-Signalweiterleitung in der Bäckerhefe *S. cerevisiae*

In *S. cerevisiae* sind MAPK-Module an der Regulation von verschiedenen Differenzierungsschritten beteiligt. Haploide Zellen unterschiedlichen Kreuzungstyps können miteinander fusionieren und diploide Zellen bilden, aus denen die Sporen hervorgehen. Unter Stickstoffmangel durchlaufen diese diploiden Zellen einen morphologischen Wechsel von hefeartigem zu pseudofilamentösem Wachstum, das durch die unipolare Aneinanderreihung verlängerter Zellen charakterisiert ist. Neben diesen Prozessen regulieren MAP-Kinasen auch Stresssignale und sorgen damit für eine zelluläre Anpassung an Umweltbedingungen. Dabei definieren fünf MAP-Kinasen, die in verschiedenen zellulären Antworten involviert sind, fünf Module, die vereinfacht in Abb. 2 dargestellt sind (einen detaillierten Überblick bieten empfehlenswerte Übersichtsartikel, in denen sich auch die Zitate finden: Elion, 2000; Gustin *et al.*, 1998; Heinisch *et al.*, 1999; Hohmann, 2002; Hunter und Plowman, 1997; Leberer *et al.*, 1997).

Der *SMK1*-Signalweg ist die am wenigsten verstandene MAPK-Kaskade in *S. cerevisiae* und besteht nur aus der MAPK Smk1p. Diese MAPK wird für die Morphogenese der Ascosporen benötigt. Bisher konnte weder eine aktivierende MAPKK noch MAPKKK identifiziert werden.

Der *SLT2*-Signalweg reguliert die Zellintegrität der Hefezellen unter verschiedenen Stressbedingungen wie niedrige Osmolarität, hohe Temperaturen, Hunger oder die Plasmamembranfusion während der Paarung zweier Hefezellen. Dieses MAPK-Modul besteht aus der MAPKKK Bck1p, zwei redundanten MAPKK Mkk1 und Mkk2, sowie der MAPK Slk2p. Aktiviert wird dieser Signalweg durch die Proteinkinase C, deren Aktivität von vielen verschiedenen Faktoren, z.B. von dem kleinen G-Protein Rho1p, beeinflusst wird. Slk2p reguliert unter anderem den MADS-Box-Transkriptionsfaktor Rlm1p und den Transkriptionsfaktorkomplex SBF und nimmt damit Einfluss auf die Expression verschiedener Zellwand- und Zellzyklusproteine.



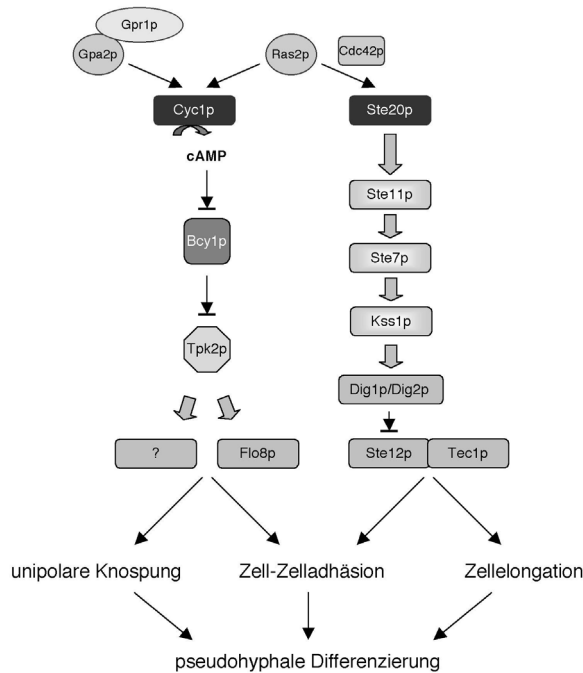
**Abbildung 2: Die fünf MAPK-Module der Bäckerhefe *S. cerevisiae*.** Jedes Modul ist durch eine spezifische MAPK charakterisiert, wohingegen andere Regulatoren häufig in mehreren Modulen zu finden sind, z.B. agieren Ste11p und Ste20p in drei und Ste7p in zwei Wegen. Dicke Pfeile stehen für Phosphorylierung, dünne Pfeile für positive Stimulierung und blockierte Pfeile für Inhibition. Erläuterungen siehe Text.

Der *HOG1*-Signalweg ist für das Wachstum unter hypertonen Bedingungen essentiell. Dieses MAPK-Modul besteht aus der MAPK Hog1p, der MAPKK Pbs2p und drei MAPKKK, Ste11p, Ssk2p und Ssk22p. Damit kann Pbs2p durch zwei unterschiedliche Systeme aktiviert werden. Der eine Zweig läuft über Ssk2p/Ssk22p und besteht aus einer eukaryotischen Version des bakteriellen Zweikomponentensystems, das sich aus drei Komponenten Sln1p, Ypd1p und Ssk1p zusammensetzt. Der andere Weg beinhaltet das putative Membran-

protein Sho1p und die MAPKKK Ste11p. Hog1p reguliert mehrere Transkriptionsfaktoren und stimuliert so z.B. die Synthese von Glycerin, das den Zellen zur Osmoprotektion dient.

Das Pheromon-MAPK-Modul setzt sich aus der MAPKKK Ste11p, der MAPKK Ste7p und der MAPK Fus3p zusammen. Die Pheromonantwort wird durch die Bindung des Pheromons an den Pheromonrezeptor ausgelöst. Sie beinhaltet die Ausbildung von so genannten Shmoos, die auf den Partner zuwachsen. In Pheromon-stimulierten Zellen kommt es zudem zu einem Zellzyklusarrest und zu einer stark erhöhten Expression von Genen, die für Zelladhäsion und Fusion der Zellen sowie Zellkerne benötigt werden. Das Pheromonsignal wird von dem aktivierten Pheromonrezeptor an ein heterotrimeres G-Protein weitergeleitet. Heterotrimere G-Proteine sind aus drei verschiedenen Untereinheiten,  $\alpha$ ,  $\beta$  und  $\gamma$  aufgebaut. Die  $\alpha$ -Untereinheit gehört zu der Superfamilie der GTPasen und trägt ein katalytisches Zentrum, das zur Bindung und Hydrolyse von GTP befähigt ist (Bourne *et al.*, 1990). Im inaktiven Zustand bindet die  $\alpha$ -Untereinheit GDP, im aktiven GTP. Nach Stimulierung des Pheromonrezeptors wird also der Komplex aus Gpa1p[GDP]/Ste4p/Ste18p ( $\alpha$ -,  $\beta$ - und  $\gamma$ -Untereinheit) aktiviert und Gpa1p bindet daraufhin GTP. Dies führt zu einer Konformationsänderung in Gpa1p und der trimere Komplex dissoziiert in Gpa1p[GTP] und Ste4p/Ste18p. Das freigesetzte  $\beta/\gamma$ -Dimer leitet nun das Signal weiter und interagiert dafür mit dem Gerüstprotein Ste5p und der Kontrollkinase Ste20p. Diese Ereignisse führen zur Aktivierung der Pheromon-MAPK-Kaskade. Aktiviertes Fus3p phosphoryliert die beiden redundanten Proteine Dig1p und Dig2p sowie Far1p. Phosphoryliertes Far1p vermittelt den Zellzyklusarrest und wird für das gerichtete Wachstum der Shmoos benötigt. Dig1p und Dig2p haben eine inhibierende Wirkung auf den Transkriptionsfaktor Ste12p, die durch ihre Phosphorylierung aufgehoben wird. Ste12p ist somit nach Pheromonstimulation aktiv und sorgt als Multimer oder in Assoziation mit Mcm1p für die Transkription der Gene, die für die Konjugation notwendig sind (Abb. 2).

Interessanterweise sind viele Komponenten der Pheromonsignalweiterleitung (siehe Abb. 2 und 3) auch an der Regulation des pseudofilamentösen Wachstums beteiligt (Gancedo, 2001; Palecek *et al.*, 2002). Unter Stickstoffmangelbedingungen wird die Kaskade auf noch nicht vollständig verstandenen Weise aktiviert. Mit den kleinen G-Proteinen Ras2p und Cdc42p sind aber zwei Faktoren bekannt, die daran beteiligt sind. Die spezifische MAPK Kss1p kann ebenso wie Fus3p die Ste12p inhibierenden Proteine Dig1p und Dig2p phosphorylieren (Abb. 3), besitzt aber darüber hinaus eine Funktion, die von der enzymatischen Aktivität unabhängig ist: Im unphosphorylierten Zustand ist Kss1p ein negativer Regulator des pseudofilamentösen Wachstums, da es mit Ste12p interagiert und seine Funktion inhibiert. Diese Interaktion wird nach Phosphorylierung von Kss1p durch Ste7p aufgehoben. Damit kommt es nach Phosphorylierung von Kss1p durch Ste7p zur Aufhebung beider Inhibitionen – die durch Dig1p/Dig2p und durch Kss1p – von Ste12p. Dies erlaubt die Interaktion von Ste12p mit Tec1p. Das entstehende Ste12p/Tec1p-Heterodimer stellt ein Transkriptionsfaktor dar, der für eine Verlängerung der sonst runden Hefezellen sorgt (Abb. 3). Die Aktivität der Kss1p-MAPK-Kaskade reicht aber für eine pseudohyphale Differenzierung nicht aus. Das



**Abbildung 3: Koregulation des pseudohyphalen Wachstums von *S. cerevisiae* durch den cAMP-Signalweg und der Kss1p-MAPK-Kaskade.** Erläuterungen siehe Text.

beeinflusst: Ras2p und der G $\alpha$ -Untereinheit Gpa2p, die mit dem putativen Glukoserezeptor Gpr1p assoziiert ist. Von den drei katalytischen Untereinheiten ist nur Tpk2p für das pseudohyphale Wachstum entscheidend, da Tpk2p den Transkriptionsfaktor Flo8p reguliert (Pan *et al.*, 2000). Die invasiven sowie adhäsiven Eigenschaften der Pseudofilamente werden durch das Kss1p-MAPK-Modul und der cAMP-Signalkaskade gemeinsam kontrolliert (Abb. 3). Dies wird besonders anhand *FLO11* deutlich, dessen Expression sowohl von Ste12p/Tec1p als auch von Flo8p reguliert wird (Rupp *et al.*, 1999). Damit benötigt *S. cerevisiae* die Aktivität beider Signalwege, um die pseudohyphale Differenzierung zu durchlaufen. Interessanterweise unterliegt in dem Reispathogen *Magnaporthe grisea* die Ausbildung der Infektionsstrukturen (Appressorien) einer ähnliche Koregulation. Für diesen Differenzierungsprozess wird sowohl die Kss1p-ähnliche MAPK Pmk1 als auch der cAMP-Signalweg benötigt (Tabelle 1; Choi und Dean, 1997; Xu und Hamer, 1996). Auch in dem Maispathogen *Ustilago maydis* und dem humanpathogenen Pilz *C. albicans* sind die jeweiligen cAMP-Signalwege für eine pathogene Entwicklung entscheidend, jedoch übernehmen in beiden Organismen die Kss1p-ähnlichen MAP-Kinasen Kpp2/Ubc3 bzw. Cek1p keine essentielle Funktion (Csank *et al.*, 1998; Dürrenberger *et al.*, 1998; Mayorga und Gold, 1999; Müller *et al.*, 1999; Rocha *et al.*, 2001). Darüber hinaus ist die Notwendigkeit eines intakten cAMP-Signalwegs oder von funktionellen MAPK-Kaskaden in einer ganzen Reihe von weiteren phytopathogenen Pilzen beschrieben worden (Di Pietro *et al.*, 2001; Hou *et al.*, 2002; Kim *et al.*, 2000a; Takano *et al.*, 2000; Takano *et al.*, 2001; Yang und Dickman,

hierfür charakteristische unipolare Knospungsmuster unterliegt der Kontrolle des cAMP-Signalwegs (Gancedo, 2001; Palecek *et al.*, 2002; Pan *et al.*, 2000). Der cAMP-Signalweg in *S. cerevisiae* ist für das vegetative Wachstum essentiell und besteht aus der Adenylatzyklase Cyc1p und der PKA. Die PKA setzt sich aus drei katalytischen Untereinheiten Tpk1p, Tpk2p und Tpk3p und einer regulatorischen Untereinheit Bcy1p zusammen und wird durch Glukose aktiviert (Abb. 3; Thevelein *et al.*, 2000; Thevelein und de Winde, 1999; Versele *et al.*, 2001). Die Aktivität von Cyc1p wird von zwei G-Proteinen

1999; Zheng *et al.*, 2000). Insgesamt scheinen in Pilzen beide Signalwege eine wichtige Funktion während der pathogenen Entwicklung einzunehmen, bisher fehlt aber ein tieferes Verständnis ihrer spezifischen Funktionen und Vernetzungen. Die detaillierten Kenntnisse in *S. cerevisiae* bieten dabei einen hilfreichen Rahmen, ersetzen aber nicht die funktionellen Analysen pathogener Organismen.

## **1.2 *Ustilago maydis* als Modellorganismus für pathogene Pilze**

In der zweiten Hälfte des letzten Jahrhunderts hat sich der Basidiomycet *Ustilago maydis* als Modellorganismus für phytopathogene Pilze etabliert. *U. maydis* ist ein biotropher Pflanzenschädling und der Erreger des Maisbeulenbrands. Er gehört systematisch zu der Familie der *Ustilaginaceae*. Diese Familie beinhaltet phytopathogene Pilze, die Blütenpflanzen aus mehr als 75 Familien befallen können (Banuett, 2002). *U. maydis* selbst besitzt ein enges Wirtsspektrum und kann nur Mais und Teosinte infizieren (Christensen, 1963). Die Forschung an *U. maydis* hat eine lange Tradition, in Europa wurde der Maisbrand zum ersten Mal 1754 von Bonnet beschrieben, 1836 ordnete Ungerer den potentiellen Erreger der Gruppe der Pilzen zu und nannte ihn *Ustilago zae*, aber erst Brefeld konnte 1883 letztlich zeigen, dass *U. zae* der Erreger dieser Krankheit ist (Christensen, 1963). Im Jahre 1944 wurde der Name dann nach den internationalen Regeln der botanischen Nomenklatur in *Ustilago maydis* geändert (Christensen, 1963). Bereits in den 60-er Jahren des vergangenen Jahrhunderts wurden in *U. maydis* wegweisende Studien zum molekularen Verständnis der homologen Rekombination durchgeführt (Holliday, 1974).

Die durch *U. maydis* ausgelöste Krankheit ist charakterisiert durch die Ausbildung von großen Gallen (Tumore) auf Ähren und Kolben von Maispflanzen. Daher wird *U. maydis* in Europa und Nordamerika als Ernteschädling angesehen. In Mittelamerika hingegen werden diese Pflanzentumore als Delikatesse angesehen und sind unter dem aztekischen Namen Huitlacoche im Handel erhältlich. Aufgrund partiell resistenter Maishybride beläuft sich der Ernteverlust durch Maisbrand jährlich allerdings auf weniger als 2 %, und führt damit zu einem geschätzten Schaden von 200 Millionen Dollar (White, 1999). Trotz der wirtschaftlich eher unbedeutenden Rolle haben mehrere Eigenschaften dazu beigetragen, dass *U. maydis* ein Modellorganismus zur Erforschung pilzlicher Pathogenitätsmechanismen geworden ist (siehe auch Kahmann *et al.*, 2000). *U. maydis* besitzt einen sexuellen Lebenszyklus, der relativ einfach und kurz ist und daher genetisches Arbeiten begünstigt. Im Labor hat die unizelluläre, haploide Phase eine Generationszeit von ungefähr 120 min. Diese haploiden Zellen bilden auf Festmedium kompakte Kolonien und sind in axenischer Kultur leicht zu vermehren. Dies erleichtert nicht nur biochemische Analysen sondern auch gentechnische Manipulationen. So ermöglichen frei-replizierende oder integrative Plasmide die funktionelle Komplementation von Mutationen, homologe Rekombination die Geninaktivierung, sowie regulierbaren Promotoren funktionelle Genanalysen (Banuett, 2002; Kahmann *et al.*, 2000). Auch die



Untersuchung des Infektionsprozesses ist mit wenig Aufwand durchführbar, da die Wirtspflanze Mais leicht kultiviert werden kann und Infektionsstudien an jungen Pflanzen innerhalb 5-10 Tagen durchgeführt werden können.

### 1.3 Der Lebenszyklus von *U. maydis*

Der sexuelle Lebenszyklus von *U. maydis* ist mit der pathogenen Entwicklung eng verknüpft und kann anhand der Kernphasen in drei verschiedene Stadien unterteilt werden: Die haploide Basidiospore, die üblicherweise als Sporidie bezeichnet wird, wächst saprophytisch, vermehrt sich durch Knospung und ist apathogen (Abb. 4A und B). Das filamentös wachsende Dikaryon geht aus zwei Sporidien hervor und ist die pathogene Form des Pilzes (Abb. 4A und B). In den Pflanzentumoren bilden sich die runden, diploiden Teliosporen, aus denen nach Meiose wieder die haploiden Sporidien entstehen (Abb. 4A und B). Lebenszyklus und Kernphasenwechsel beinhalten also diskrete morphologische Veränderungen (Banuett, 2002; Kahmann *et al.*, 2000).

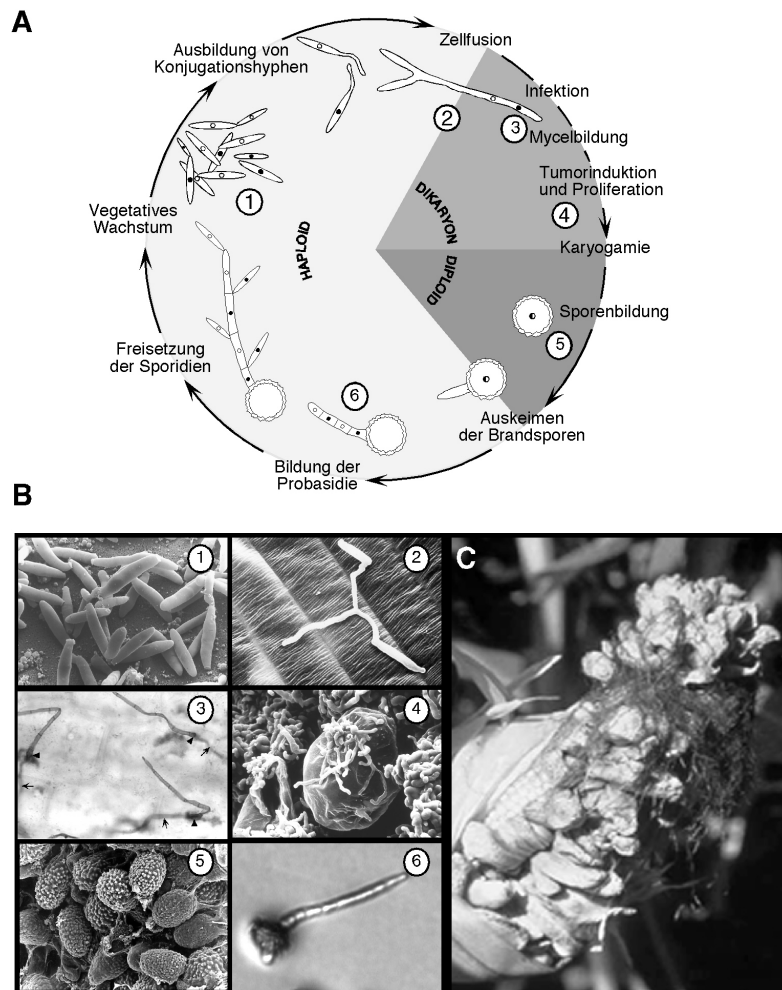
#### 1.3.1 Der Infektionsprozess

Der Infektionsprozess von *U. maydis* beginnt mit der gegenseitigen Erkennung zweier kompatibler Sporidien, die unterschiedliche Allele der Paarungstyploci tragen (Banuett, 2002; Kahmann *et al.*, 2000). Diese Sporidien bilden so genannte Konjugationshyphen aus, die an ihrer Spitze fusionieren (Abb. 4A und B; Snetselaar, 1993; Snetselaar *et al.*, 1996). Nach dieser Zellfusion entsteht das dikaryotische Filament. Im Labor können diese Prozesse der Zellerkennung, Fusion und Ausbildung des Dikaryons auf künstlichen Medien beobachtet werden. Die dikaryotischen Hyphen erscheinen dabei als weißliches, pelzartiges Myzel und sind damit leicht von den haploiden Sporidien zu unterscheiden, die Kolonien mit einer glatt-grauen Oberfläche bilden (Puhalla, 1968; Rowell, 1955). Für alle weiteren Schritte des Lebenszyklus ist *U. maydis* auf seine Wirtspflanze angewiesen.

Das dikaryotische Filament besteht außerhalb der Pflanze aus nur einer Zelle, die in regelmäßigen Abständen im distalen Bereich leere Abschnitte hinterlässt (Steinberg *et al.*, 1998). In Verbindung mit einer Neusynthese von Zellwandmaterial an der Zellspitze ist das Dikaryon in der Lage, auf der Pflanzenoberfläche eine geeignete Stelle für die Penetration zu suchen. Für die Penetration bildet das Dikaryon eine Infektionsstruktur aus, die den Appressorien anderer phytopathogener Pilze wie z.B. *M. grisea* ähnlich ist (Abb. 4B; Snetselaar und Mims, 1992; Snetselaar und Mims, 1993). Bisher ist nicht bekannt, ob die Infektionszelle mechanische Kräfte anwendet, die Pflanzenzellwand durch Exoenzyme abbaut oder eine Kombination von beiden benutzt, um ein punktuell Durchdringen der Kutikula und Epidermis zu ermöglichen.

In der Pflanze wächst das Dikaryon zunächst vorwiegend intrazellulär, ohne dabei die Plasmamembran der Wirtszellen zu zerstören (Banuett und Herskowitz, 1994b; Snetselaar

und Mims, 1994). Zu diesem Zeitpunkt treten die ersten Symptome, Chlorosen und Anthocyanbildung, an den infizierten Pflanzen auf, es kommt aber zu keiner weiteren offensichtlichen Pflanzenabwehr.



**Abbildung 4: Der Lebenszyklus von *U. maydis*.** A) Schematische Darstellung des Lebenszyklus, Einzelheiten siehe Text. Die Zahlen beziehen sich auf die entsprechenden Stadien in B). B) Rasterelektronen- und Lichtmikroskopische Aufnahmen von *U. maydis*-Zellen. (1) Haploide Sporidien vermehren sich vegetativ durch Sprossung. (2) Fusion zweier haploider Zellen und Dikaryonbildung auf der Blattoberfläche. (3) Von Infektionsstrukturen (Pfeilköpfe) penetrieren Infektionshyphen (Pfeile) die Pflanzenoberfläche. (4) Starke Proliferation des Pilzmyzels im Tumor. (5) Bildung der Brandsporen in den sporogenen Hyphen. (6) Keimung einer Teliospore unter Ausbildung des Promyzels. C) Tumorbildung auf einem Maiskolben. Die Abbildungen wurden freundlicherweise zur Verfügung gestellt von: G. Wanner, C. Quadbeck-Seeger, J. Kämper (1, 4, 5), K. Snetselaar (2), J. Schirawski (3) und S. Huber (6).

Im weiteren Verlauf der Infektion beginnt das Dikaryon sich zu teilen und als dikaryotisches Myzel zu wachsen (Banuett und Herskowitz, 1994b). Die Ausbildung von Pflanzentumoren kann etwa fünf Tage nach Infektion beobachtet werden (Abb. 4C). Sie können sich am Stamm, an den Blättern, sowie an den weiblichen und männlichen Blüten bilden (Christensen, 1963). In diesen Tumoren (Gallen) kommt es dann zu einer massiven Proliferation des

dikaryotischen Myzels (Abb. 4B; Banuett und Herskowitz, 1994b). Nach Fragmentierung differenzieren sich die Pilzfilamente in sporogene Hyphen, aus denen diploide Teliosporen hervorgehen (Banuett und Herskowitz, 1996; Abb. 4B). Der genaue Zeitpunkt der Kernfusion ist nicht bekannt, findet aber wahrscheinlich am Ende der Proliferationsphase statt. Der Tumor ist im reifen Stadium mit riesigen Mengen an Teliosporen gefüllt ( $2,5 - 6 \times 10^9$  Sporen/cm<sup>3</sup>), die von einer schwarzen pigmentierten Sporenhülle umgeben sind (Christensen, 1963). So erscheint der Tumor schwarz, was zu dem Namen Maisbeulenbrand geführt hat (Abb. 4B).

Wenn die Tumore aufbrechen, werden die Sporen entlassen und durch Wind und Regen verbreitet. Der Lebenszyklus ist vollendet, wenn die diploiden Sporen unter günstigen Bedingungen zu Probasidien auskeimen, und sich von diesen nach Meiose die haploiden Sporidien abschnüren (Abb. 4A und B; Christensen, 1963).

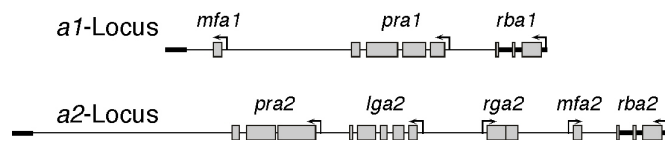
### 1.3.2 Der Lebenszyklus unterliegt der Kontrolle der Paarungstyploci

Der Lebenszyklus von *U. maydis* wird genetisch durch die zwei ungekoppelten Paarungstyploci *a* und *b* kontrolliert. Er kann nur dann vollständig durchlaufen werden, wenn beide Fusionspartner in *a* und *b* verschieden sind (Holliday, 1961; Puhalla, 1968; Rowell, 1955; Rowell und DeVay, 1954). Der *a*-Locus existiert in den Allelen *a1* und *a2*, während von dem *b*-Locus mindestens 33 Allele bekannt sind (Kahmann *et al.*, 1995; Rowell und DeVay, 1954). Experimente mit haploiden und stabilen diploiden Stämmen ermöglichten es, den Loci diskrete Aufgaben während des Lebenszyklus zuzuweisen. Der *a*-Locus kontrolliert die Fusion der Sporidien, der *b*-Locus die Pathogenität; die Aufrechterhaltung des filamentös wachsenden Dikaryons wird von beiden Loci gesteuert (Banuett und Herskowitz, 1989; Holliday, 1961; Puhalla, 1968). Die Klonierung der beiden Allele des *a*-Locus und mehrerer Allele des *b*-Locus eröffnete die Möglichkeit ihrer molekularen Analyse (Bölker *et al.*, 1992; Froeliger und Leong, 1991; Kronstad und Leong, 1989; Schulz *et al.*, 1990).

#### 1.3.2.1 Der *a*-Locus kodiert für ein Pheromon/Pheromonrezeptor-System

Die Allele *a1* und *a2* enthalten heterologe Sequenzen von 4,5 kb (*a1*) bzw. 8,0 kb (*a2*) und werden von homologen Bereichen flankiert (Bölker *et al.*, 1992; Froeliger und Leong, 1991). In Übereinstimmung mit ihrer Funktion bei der Zellfusion befinden sich auf dem *a*-Locus die Gene für Komponenten eines Zell/Zell-Erkennungssystems, das die Fusion zweier Sporidien mit unterschiedlichen *a*-Allelen ermöglicht. Im *a*-Locus liegen jeweils die Gene für einen Pheromonrezeptor *Pra* (*pheromone receptor a*) und für einen Vorläufer eines Pheromons *Mfa* (*mating factor a*; Abb. 5; Bölker *et al.*, 1992). Zusätzlich enthält der *a2*-Locus zwei weitere Gene, *lga2* und *rga2*, deren Funktionen jedoch unbekannt sind (Urban *et al.*, 1996a).

Durch Analyse verschiedener Mutanten konnte gezeigt werden, dass die Erkennung und Fusion auf diesem System aus Pheromon und Rezeptor beruht. Die Inaktivierung der Phero-



**Abbildung 5: Der *a*-Locus kodiert für ein Pheromon-Pheromonrezeptorsystem.** Schematische Darstellung des *a1*- und des *a2*-Locus. Auf der rechten Seite sind zusätzlich die außerhalb der *a*-Loci liegenden Gene *rba1* bzw. *rba2* angedeutet. Diese beiden Gene sind in ihren N-Termini identisch, besitzen aber unterschiedliche C-Termini (Urban *et al.*, 1996a). Der *a1*- und der *a2*-Locus sind von homologen DNA-Flanken begrenzt (dicke Striche), die dicken Kästen stehen für kodierende Bereiche.

methyliert sind (Spellig *et al.*, 1994). Die extrazelluläre Erkennung der Sporidien erfolgt kreuzweise, das von dem *a2*-Locus kodierte Pheromon Mfa2 aktiviert Pra1 und Pra2 bindet das *a1*-Pheromon Mfa1. Die Pheromonrezeptoren können aufgrund ihrer Aminosäuresequenz in die Klasse D der Familie der G-Protein-gekoppelten-Rezeptoren eingeordnet werden, zu der auch andere pilzliche Pheromonrezeptoren gehören (<http://www.gpcr.org/7tm/multali/multali.html>).

### 1.3.2.2 Der *b*-Locus kodiert für den zentralen Regulator der Pathogenität

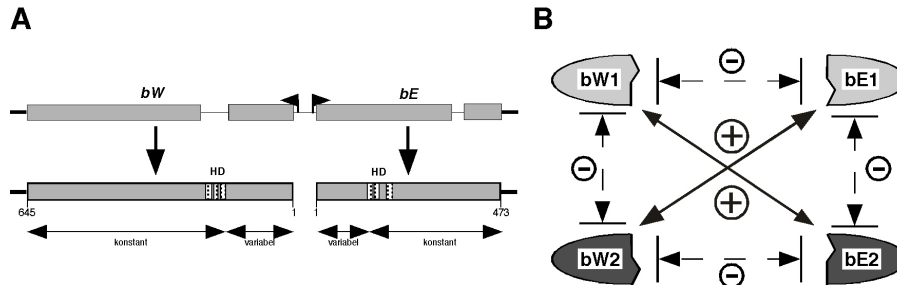
Bislang sind mehrere Allele des *b*-Locus kloniert und sequenziert worden. Jedes Allel des *b*-Locus trägt zwei divergent transkribierte Gene, *bE* (*bEast*) und *bW* (*bWest*), die für die zwei Proteine bE bzw. bW kodieren (Abb. 6; Gillissen *et al.*, 1992). Es konnte gezeigt werden, dass ein Stamm nur dann die pathogene Entwicklung durchlaufen kann, wenn ein *bW* mit einem *bE* eines anderen Allels kombiniert wird. So ist z.B. der künstlich erzeugte, haploide Stamm CL13, der das Genpaar *bW2* und *bE1* enthält, ohne vorherige Zellfusion pathogen (Bölker *et al.*, 1995b). Neben solchen haploid-solopathogenen Stämmen gibt es natürlich vorkommende, diploide Stämme mit unterschiedlichen *b*-Loci, die ebenfalls solopathogen sind (Christensen, 1963; Holliday, 1974).

Die beiden Proteine bE und bW weisen zwar geringe Homologie zueinander auf, sind aber sehr ähnlich aufgebaut: Sie bestehen aus einem N-terminalen, in verschiedenen Allelen variablen und einem C-terminalen konstanten Bereich, der in allen Allelen weitgehend identisch ist (Kronstad und Leong, 1990). Mit Hilfe von molekularen und biochemischen Methoden konnte bewiesen werden, dass ausschließlich bE- und bW-Proteine unterschiedlicher Allele dimerisieren (Abb. 6). Diese Interaktion wird durch die variablen N-terminalen Bereiche der Proteine vermittelt (Kämper *et al.*, 1995).

Angrenzend an die variable Bereiche finden sich sowohl in bW als auch in bE eine Homeodomäne, die beide für die Funktion des Heterodimers unerlässlich sind. Bei der Homeo-

mon- oder Rezeptorgene führt zur Sterilität und zwei Stämme, die gleiche *a*-Loci tragen, können nicht fusionieren (Bölker *et al.*, 1992). Das Vorläuferpeptid von Mfa1 ist 40, das von Mfa2 38 Aminosäuren lang und werden posttranslational prozessiert und modifiziert, so dass die reifen Pheromone aus 13 bzw. 9 Aminosäuren bestehen und an ihren C-Termini farnesyliert und carboxy-

domäne handelt es sich um ein „Helix-Turn-Helix“-DNA-Bindemotiv, das in Transkriptionsfaktoren von zahlreichen Eukaryoten zu finden ist. Es wurde gezeigt, dass ein aktives bE/bW Heterodimer eine Vielzahl von Genen direkt oder indirekt reguliert (Brachmann *et al.*, 2001; Romeis *et al.*, 2000).



**Abbildung 6: A) Schematische Darstellung des *b*-Locus und der davon kodierten Homeodomänen-Proteine *bW* und *bE*.** Die dicken Kästen stehen für kodierende Bereiche. Die Länge der Proteine ist in Aminosäuren angegeben. Bei der Darstellung bezeichnet HD die Homeodomänen in *bW* und *bE*. **B) Allelspezifische Dimerisierung der *b*-Proteine.** *bW*- und *bE*-Proteine dimerisieren nur dann miteinander, wenn sie von unterschiedlichen Allelen stammen.

## 1.4 Die Pheromonantwort

In *U. maydis* führt erst die Fusion zweier kompatibler Sporidien zur Ausbildung des pathogenen Dikaryons. Die hierfür erforderliche Pheromonstimulation löst eine Reihe von morphologischen und transkriptionellen Veränderungen aus, die insgesamt als Pheromonantwort bezeichnet werden.

Das morphologische Merkmal dieser Antwort ist die Ausbildung von Konjugationshyphen, die gerichtet auf die Pheromonquelle zuwachsen (Snetselaar *et al.*, 1996). Es kommt dabei zu einem Zellzyklusarrest in der G<sub>2</sub>-Phase (J. Perez-Martin, persönliche Mitteilung). Nachdem die Konjugationshyphen an ihren Spitzen fusioniert sind, bildet sich das Dikaryon, indem die Zellkerne der Fusionspartner durch die Konjugationsschläuche in das neu gebildete Filament einwandern (Banuett und Herskowitz, 1994b, Snetselaar, 1993). In dem gebildeten Dikaryon sorgt dann vermutlich das aktive b-Heterodimer für den Fortbestand des Zellzyklusarrests, da ein Fusionsprodukt, das keine b-Heterodimere ausbilden kann, viele Kerne trägt und als Filament nicht stabil ist (Banuett und Herskowitz, 1989).

Neben der Konjugationshyphenbildung stimuliert Pheromon die Expression der Gene im *a*-Locus (Urban *et al.*, 1996b). Dies verstärkt das perzipierte Pheromonsignal und bewirkt somit vermutlich das gerichtete Wachstum der Konjugationshyphen auf die Pheromonquelle zu (Snetselaar *et al.*, 1996). Zusätzlich wird die Transkription der *b*-Gene erhöht, um ausreichend b-Proteine schon vor der Fusion bereitzustellen (Urban *et al.*, 1996b). Nach der Zellfusion

sorgt dann eine autokrine Pheromonstimulation für die weitere Expression aktiver b-Heterodimere, die auf noch unbekannte Weise die positive Pheromonrückkopplung dämpfen (Urban *et al.*, 1996b).

### 1.4.1 Prf1 ist der zentrale Regulator der Pheromonantwort

Die Pheromon-induzierte Expression der *a*- und *b*-Loci Gene wird durch das *cis*-aktive Sequenzmotiv PRE (*pheromone response element*) vermittelt, das in den regulatorischen Sequenzen dieser Gene zum Teil mehrfach wiederholt zu finden ist (Urban *et al.*, 1996b). Als zentraler Regulator, der an diese PRE-Boxen bindet, wurde der zu der Familie der HMG-Box-Proteine (*high mobility group*) gehörende Transkriptionsfaktor Prf1 (*pheromon response factor 1*) identifiziert (Hartmann *et al.*, 1996). Die Analysen von *prf1*-Deletionsmutanten haben gezeigt, dass Prf1 die Pheromon-induzierte und die basale Transkription der *a*- und *b*-Gene reguliert (Hartmann *et al.*, 1996). Aus diesem Grund können *prf1*-Deletionsmutanten weder auf Pheromon reagieren, noch mit Wildtypzellen fusionieren. Prf1 ist somit der zentrale Regulator der Pheromonantwort, und die Expression von *prf1* ist Voraussetzung für die Paarungskompetenz der Sporidien. Die Transkription von *prf1* unterliegt einer komplexen Regulation von Pheromon und Umweltfaktoren. Der Promotor von *prf1* enthält neben zwei PRE-Boxen, die eine Autoregulation vermitteln, ein regulatorisches Element (UAS, *upstream activating sequence*), das die *prf1*-Transkription in Abhängigkeit der Kohlenstoffquelle reguliert (Hartmann *et al.*, 1999). Ein Verlust dieser transkriptionellen Regulation führt zu Sterilität. Auf Grund seiner Affinität zu der UAS wurde der Transkriptionsfaktor Ncp1 aufgereinigt, der zu der Familie der Zinkfingerproteine gehört (Hartmann *et al.*, 1999). *ncp1*-Deletionsmutanten zeigen aber nur einen leichten Defekt in der *prf1*-Expression, so dass angenommen wird, dass weitere Faktoren an der Regulation über das UAS-Element teilnehmen.

### 1.4.2 Signalweiterleitung während der Zell-Zell-Erkennung

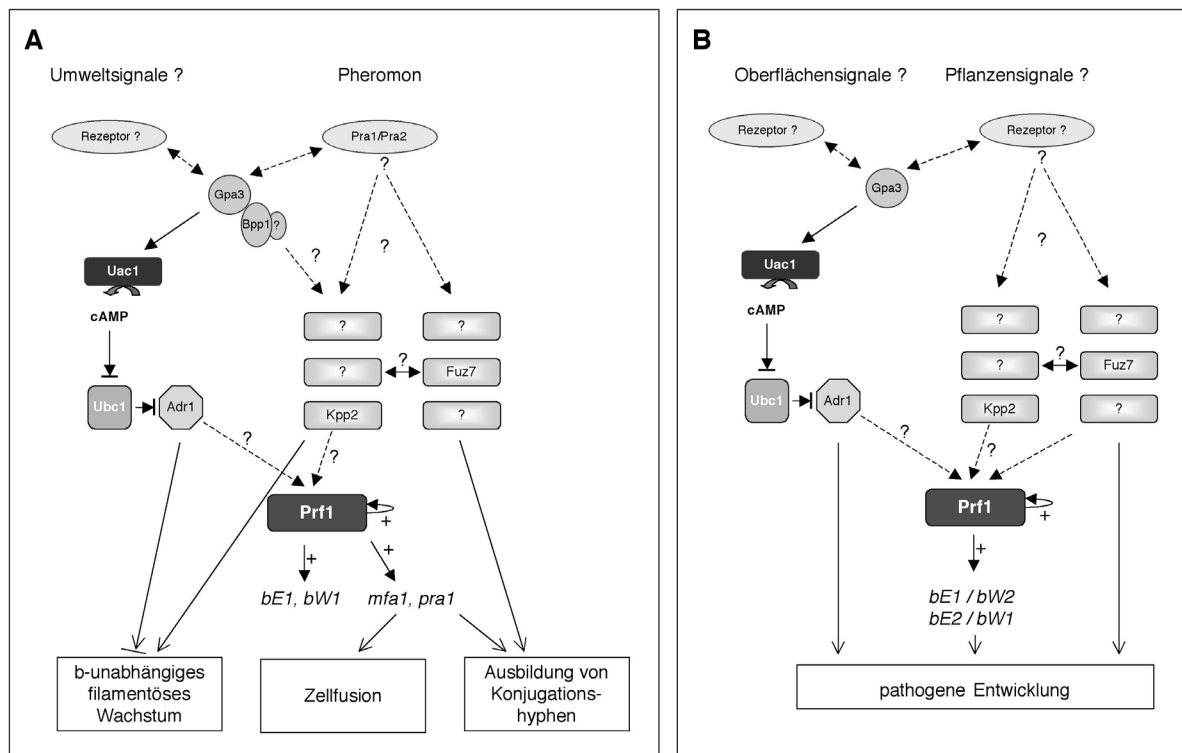
Während der Pheromonantwort muss das Signal von den aktivierten Pheromonrezeptoren zu Prf1 weitergeleitet werden. Die Pheromonrezeptoren von *U. maydis*, Pra1 und Pra2, zeigen in ihrer Sequenz Ähnlichkeiten zu den Pheromonrezeptoren der Bäckerhefe, von denen gezeigt worden ist, dass sie an ein heterotrimeres G-Protein gekoppelt sind (Blumer und Thorner, 1990; Nomoto *et al.*, 1990). In *U. maydis* konnten vier Gene, *gpa1* - *gpa4*, die für  $\alpha$ -Untereinheiten heterotrimerer G-Proteine kodieren, und ein Gen für eine  $\beta$ -Untereinheit (*bpp1*) isoliert werden, aber nur Gpa3 und Bpp1 spielen während der Pheromonantwort eine wichtige Rolle (Müller *et al.*, 2003b; Regenfelder *et al.*, 1997). *gpa3*- sowie *bpp1*-Deletionsmutanten zeigen eine stark reduzierte Paarungskompetenz und besitzen einen Defekt in der basalen und Pheromon-induzierten Expression der *a*-Gene (Müller *et al.*, 2003b; Regenfelder *et al.*, 1997). In verschiedenen Experimenten konnte gezeigt werden, dass Gpa3 und Bpp1 Komponenten der cAMP-Signalkaskade sind. *gpa3*- und *bpp1*-Nullmutanten zeichnen sich durch einen er-

niedrigsten intrazellulären cAMP-Spiegel aus, und ihre reduzierte Paarungskompetenz sowie *a*-Genexpression kann durch die Zugabe von cAMP in das Wachstumsmedium aufgehoben werden (Krüger, 1999; Krüger *et al.*, 1998; Müller *et al.*, 2003b). Die Hauptkomponenten des cAMP-Signalwegs von *U. maydis* sind die Adenylatzyklase Uac1 und die PKA, die sich aus einer regulatorischen (Ubc1) sowie der katalytischen Untereinheit Adr1 zusammensetzt (Barrett *et al.*, 1993; Gold *et al.*, 1997; Orth *et al.*, 1995; Dürrenberger *et al.*, 1998). Der Verlust von *uac1* oder *adr1* führt zu Defekten in der Paarungskompetenz sowie *a*-Genexpression (Dürrenberger *et al.*, 1998; Krüger *et al.*, 1998). Ein Verlust der Signalweiterleitung über die cAMP-Kaskade hat also einen dramatischen Defekt in der Paarungskompetenz zur Folge. Im Gegensatz dazu induziert eine Aktivierung der Kaskade, die man z.B. durch Zugabe von cAMP, durch Expression des dominant-aktiven Allels *gpa3*<sub>Q206L</sub>, oder durch die Deletion der regulatorischen Untereinheit Ubc1 erreichen kann, die Expression der Pheromogene (Hartmann *et al.*, 1999; Krüger *et al.*, 1998; Müller *et al.*, 1999; Regenfelder *et al.*, 1997). Interessanterweise besitzt Prf1 fünf potentielle PKA-Phosphorylierungsstellen. Werden diese durch Punktmutationen zerstört, führt dies zu einer reduzierten Paarungskompetenz und die cAMP-induzierte Expression des Pheromogens wird nicht mehr beobachtet (M. Feldbrügge, persönliche Mitteilung). Daher ist es möglich, dass das Pheromonsignal durch die Aktivierung von Gpa3 über Uac1 durch einen Anstieg des cAMP-Spiegels auf die Proteinkinase Adr1 weitergeleitet wird, die dann Prf1 modifizieren kann (Abb. 7A). Es sprechen aber zwei Beobachtungen dafür, dass noch mindestens ein zusätzlicher Signalweg an der Weiterleitung des Phermonsignals beteiligt ist. Zum einem kann die Zugabe von cAMP die Sterilität von Pheromonrezeptormutanten nicht aufheben, zum andern führt die Aktivierung des cAMP-Signalwegs nicht zur Ausbildung von Konjugationshyphen (Krüger *et al.*, 1998; Regenfelder *et al.*, 1997).

Neben den PKA-Phosphorylierungsstellen besitzt Prf1 auch sechs putative MAPK-Phosphorylierungsstellen sowie zwei verschiedene MAPK-Interaktionsdomänen, deren Zerstörung ebenfalls zu einer reduzierten Paarungskompetenz führt (Müller *et al.*, 1999). Damit erscheint es wahrscheinlich, dass auch eine MAPK-Kinase an der Modifizierung von Prf1 beteiligt ist. Es wurden bisher zwei Gene aus *U. maydis* isoliert, die für eine MAPKK (Fuz7) bzw. MAPK (Kpp2) kodieren (Banuett und Herskowitz, 1994a; Mayorga und Gold, 1999; Müller *et al.*, 1999). Beide Proteine besitzen hohe Ähnlichkeit zu Komponenten der MAPK-Kaskade aus *S. cerevisiae*, Ste7p bzw. Fus3p, die in dieser Hefe das Pheromonsignal übermitteln. *kpp2*- sowie *fuz7*-Mutanten zeigen eine stark reduzierte Dikaryenbildung und sind nicht in der Lage Konjugationshyphen auszubilden (Banuett und Herskowitz, 1994a; Mayorga und Gold, 1999; Müller *et al.*, 1999). Diese Beobachtungen weisen auf eine Funktion von Fuz7 und Kpp2 während der Pheromonantwort hin und lassen vermuten, dass beide Kinasen in einer Kaskade agieren. Weiterführende Experimente haben jedoch gezeigt, dass die basale und die Pheromon-induzierte Expression der *a*-Gene in *kpp2*- nicht aber in *fuz7*-Mutanten gestört ist (Müller *et al.*, 1999; Regenfelder *et al.*, 1997). Daher wurde postuliert, dass Fuz7 und Kpp2

vermutlich nicht in einem Modul liegen, beide aber direkt an der Übermittlung des Pheromonsignals beteiligt sein könnten (Abb. 7A). Es wäre z.B. vorstellbar, dass Fuz7 für die Konjugationshyphenbildung notwendig ist und Kpp2 für die Aktivierung von Prf1 benötigt wird (Abb. 7A).

In Bezug auf die Morphologie haploider Sporidien kommt dem cAMP-Signalweg eine zusätzliche Rolle zu. Stämme, in denen die cAMP-Kaskade nicht aktiv ist (durch Deletion von *gpa3*, *bpp1*, *uac1* oder *adr1* hervorgerufen) wachsen konstitutiv filamentös, unabhängig von der Anwesenheit eines aktiven b-Heterodimers (Barrett *et al.*, 1993; Dürrenberger *et al.*, 1998; Müller *et al.*, 2003b; Regenfelder *et al.*, 1997).



**Abbildung 7: Signalweiterleitung während der Pheromonantwort (A) und der pathogenen Entwicklung (B).** **A)** Die Pheromonstimulation führt zu einer Aktivierung von Prf1. Prf1 induziert die Expression der *a*- und *b*-Locus Gene und, autoregulatorisch, die des *prf1*-Gens (Pfeile mit Pluszeichen). Die  $\alpha$ -Untereinheit Gpa3, die  $\beta$ -Untereinheit Bpp1 sowie der cAMP-Signalweg können an der Weiterleitung des Pheromonsignals beteiligt sein (siehe Text). Es ist aber auch möglich, dass diese Komponenten Umweltsignale weiterleiten, die den Paarungsprozess beeinflussen. Die Aktivität von Prf1 kann wahrscheinlich auch durch Kpp2 beeinflusst werden, das genauso wie Fuz7 für die Ausbildung der Konjugationshyphen benötigt wird. **B)** Während der pathogenen Entwicklung sorgen Umwelt und/oder Pflanzensignale für die Expression aktiver b-Heterodimere, Regulatoren der pathogenen Entwicklung. Unabhängig davon ist auch der cAMP-Signalweg für die Pathogenität notwendig. Die MAPK-Komponenten Kpp2 und Fuz7 haben einen unterschiedlichen Einfluss auf die pathogene Entwicklung, der noch nicht näher untersucht wurde.

Ein aktivierter cAMP-Signalweg (durch Zugabe von cAMP oder Deletion von *ubc1*) führt hingegen zu Defekten in der Zytokinese, es kommt zur Ausbildung von Knospen, die sich



nicht mehr von der Mutterzelle abtrennen (Gold *et al.*, 1994). Interessanterweise konnte eine genetische Interaktion zwischen *kpp2* und *uac1* nachgewiesen werden. In einem Ansatz, in dem nach Komponenten gesucht wurde, die den filamentösen Phänotyp der *uac1*-Deletionsmutanten unterdrücken, wurde nicht nur *ubc1* (*ustilago bypass of cyclase*), sondern auch *ubc3* identifiziert, das mit *kpp2* identisch ist (Mayorga und Gold, 1999). Stämme, die in *uac1* und *ubc3/kpp2* deletiert sind, haben ein normales Knospungsmuster. Dies spricht für eine antagonistische Rolle von Kpp2 und der cAMP-Kaskade auf die Zellmorphologie; es ist aber unklar auf welcher Ebene diese Signalwege interagieren (Abb. 7A).

### 1.4.3 Signalweiterleitung während der pathogenen Entwicklung

In *U. maydis* ist das b-Heterodimer, das sich nach Fusion zweier Sporidien ausbildet, der zentrale Regulator der Pathogenität. Stämme, die kein aktives b-Heterodimer ausbilden, sind apathogen. Interessanterweise wird der autokrine Pheromonstimulus, der auf künstlichen Nährmedien über Prf1 die Menge an b-Proteinen kontrolliert, während der biotrophen Phase für die Expression der *b*-Gene nicht benötigt. Ein Stamm, der nicht zur autokrinen Pheromonstimulation befähigt ist, aber aktive b-Heterodimere ausbilden kann, ist solopathogen (Banuett und Herskowitz, 1989; Bölker *et al.*, 1995a). Auch in solchen Stämmen führt die Deletion von *prf1* zum Verlust der Pathogenität, die aber durch eine konstitutive Expression eines aktiven b-Heterodimers wieder hergestellt werden kann (Hartmann *et al.*, 1996). Während der pathogenen Entwicklung müssen somit ein oder mehrere noch nicht bekannte Pflanzen- oder Oberflächensignale auf Prf1 übertragen werden, um die Expression der b-Heterodimere zu ermöglichen (Abb. 7B).

Für eine Signalweiterleitung während der pathogenen Entwicklung könnte z.B. der cAMP-Signalweg verantwortlich sein, da Mutanten, in denen der cAMP-Signalweg durch Deletion von *gpa3*, *uac1* oder *adr1* zerstört ist, nicht mehr in der Lage sind, Symptome zu induzieren (Dürrenberger *et al.*, 1998; Regenfelder *et al.*, 1997). Stämme, die eine aktivierte cAMP-Kaskade aufweisen, sind zwar noch in der Lage, in die Wirtspflanze einzudringen, können aber ebenfalls den Lebenszyklus nicht mehr durchlaufen (Gold *et al.*, 1997). Die Entwicklung von *ubc1*-Deletionsstämmen arretiert in einer frühen Infektionsphase und man beobachtet keine Tumorinduktion. Stämme, die das dominant-aktive Allel *gpa3*<sub>Q206L</sub> exprimieren, können zwar Tumore induzieren, in denen erfolgt jedoch keine Proliferation und die Ausbildung von Teliosporen unterbleibt (Krüger *et al.*, 2000). Eine Aktivierung der cAMP-Kaskade scheint also für die frühen Infektionsschritte notwendig zu sein, während der späteren Schritte des Lebenszyklus wirkt sie sich hingegen negativ auf die Entwicklung aus. Interessanterweise kann die konstitutive Expression eines aktiven b-Heterodimers den Verlust der Pathogenität weder in *gpa3*- noch in *adr1*-Mutanten aufheben (Regenfelder *et al.*, 1997; U. Voss, persönliche Mitteilung). Dies könnte bedeuten, dass die cAMP-Kaskade die b-Proteine

posttranskriptionell reguliert und/oder andere Faktoren aktiviert, die neben den b-Heterodimeren für die Pathogenität essentiell sind (Abb. 7B).

Zusätzlich zu der cAMP-Kaskade scheinen auch Fuz7 und Kpp2 an der Übermittlung von Signalen während der biotrophen Phase beteiligt zu sein. *fuz7*-Mutanten weisen eine dramatische Reduktion in der Pathogenität auf (Banuett und Herskowitz, 1994a). Der Verlust von *kpp2* führt dagegen nur zu einer reduzierten Tumorbildung (Mayorga und Gold, 1999; Müller *et al.*, 1999). Diese unterschiedlich starken Einflüsse auf die Pathogenität passen zu der Annahme, dass Kpp2 und Fuz7 in verschiedenen Kaskaden agieren und eine zweite MAPK von Fuz7 aktiviert wird (Abb. 7B). Ob diese postulierten Module an der Regulation der *b*-Gene beteiligt sind oder für die Aktivierung anderer Pathogenitätsfaktoren benötigt werden, ist nicht bekannt.

## 1.5 Fragestellung dieser Arbeit

Das Ziel dieser Arbeit war die Charakterisierung der Kpp2-MAPK-Kaskade und der Prozesse, die von dieser MAPK reguliert werden (Weiterleitung des Pheromonsignals und Signalweiterleitung während der pathogenen Entwicklung von *U. maydis*). Insbesondere sollte eine Einordnung von *fuz7* erfolgen, da die bisherigen Analysen der *fuz7*- und *kpp2*-Deletionsmutanten zu widersprüchlichen Schlussfolgerungen bezüglich ihrer Funktionen während des Lebenszyklus geführt hatten (Banuett und Herskowitz, 1994a; Mayorga und Gold, 1999; Müller *et al.*, 1999; Regenfelder *et al.*, 1997). Aus *S. cerevisiae* war bekannt, dass verschiedene MAPK-Kaskaden gemeinsame Komponenten nutzen können und die Spezifität letztendlich durch die MAPK definiert wird. Besonders eindrucksvoll wird das an der MAPKKK Ste11p deutlich, die in drei der fünf existierenden Module agieren kann (Abb. 2). Mit *kpp4* war in *U. maydis* ein Genfragment identifiziert worden, das für eine Ste11p-ähnliche MAPKKK kodiert (P. Müller, nicht publiziert). *kpp4* sollte als Werkzeug dienen, um die Komponenten Kpp2 und Fuz7 in Kaskaden einzuordnen. Hierfür sollte zunächst das gesamte *kpp4*-Gen charakterisiert und anhand von Deletionsmutanten die Aufgaben von *kpp4* untersucht werden. Des weiteren sollte mit Hilfe von genetischen und biochemischen Methoden das Verhältnis von Kpp4, Fuz7 und Kpp2 untersucht werden. Darüber hinaus war es von Interesse, die Aufgaben dieser Komponenten während des gesamten Lebenszyklus zu untersuchen, sowie die genetische Verbindung von Kpp2 zu dem cAMP-Signalweg näher zu beleuchten. Dies sollte helfen, ein tieferes Verständnis der Signalweiterleitung über MAPK-Kaskaden und ihre Verschaltung mit dem cAMP-Signalweg in pathogenen Pilzen zu erhalten. Vom besonderem Interesse war dabei der Einfluss der MAPK Kpp2 auf den Transkriptionsfaktor Prf1 und somit auf die Pheromon-regulierte *a*- und *b*-Genexpression.

## 2 Ergebnisse

### 2.1 Genetische Charakterisierung der Pheromon-MAPK-Kaskade

In *U. maydis* sind mehrere Gene isoliert worden, die aufgrund der Charakteristika ihrer abgeleiteten Aminosäuresequenz für Komponenten von MAPK-Modulen kodieren könnten. Durch erste Analysen von Deletionsmutanten wurden bisher nur einer MAPK (Kpp2) und einer MAPKK (Fuz7) eine Funktion zugeschrieben. *kpp2*- und *fuz7*-Deletionsmutanten zeigen eine reduzierte Paarungskompetenz und sind nicht mehr in der Lage Konjugationshyphen auszubilden, wenn sie mit einem kompatiblen Stamm konfrontiert werden (Banuett und Herskowitz, 1994a; Mayorga und Gold, 1999; Müller *et al.*, 1999). Überraschenderweise ist aber die Pheromon-regulierte Expression des Pheromogens *mfa1* durch den Verlust von *fuz7* nicht beeinträchtigt, wohingegen *kpp2*-Deletionsmutanten eine deutlich reduzierte Antwort aufweisen (Müller *et al.*, 1999; Regenfelder *et al.*, 1997). Aufgrund dieses Unterschieds war postuliert worden, dass beide Komponenten zwar für die Pheromonantwort wichtig sind, aber in unterschiedlichen Kaskaden agieren (Müller *et al.*, 1999). Mit *kpp4*, war ein Genfragment isoliert worden, dessen abgeleitetes Protein hohe Ähnlichkeit zu den MAPKK-Kinasen Byr2 und Ste11p aus *S. pombe* bzw. *S. cerevisiae* besitzt. Da sowohl Byr2 als auch Ste11p an der Weiterleitung des Pheromonsignals beteiligt sind, sollte die Analyse von *kpp4*-Deletionsmutanten zeigen, ob Kpp4 eine Funktion während des Kreuzungsprozesses von *U. maydis* inne hat. Insbesondere war es von Interesse, mit Hilfe dieser in einem MAPK-Modul hierarchisch am höchsten stehenden Kinase die Beziehung zwischen den bekannten Komponenten Fuz7 und Kpp2 zu klären und zu untersuchen, auf welche Art und Weise diese Komponenten an der Weiterleitung des Pheromonsignals beteiligt sind.

#### 2.1.1 *kpp4* kodiert für eine MAPKKK

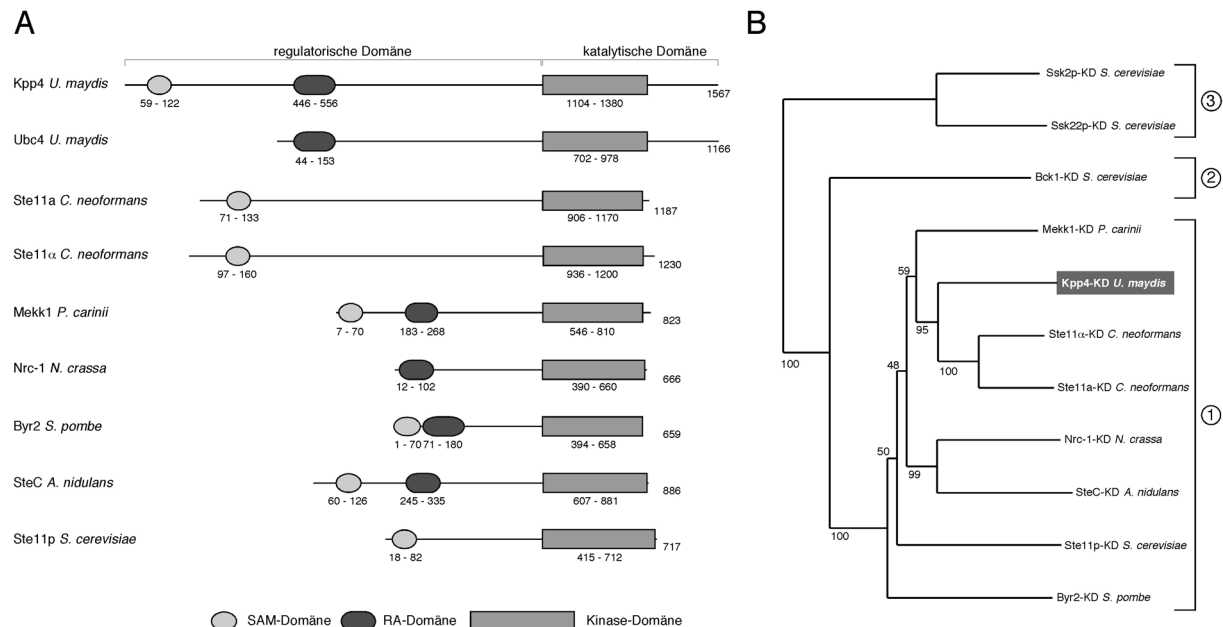
In vorangegangenen Arbeiten konnte die Sequenzanalyse des gesamten *kpp4*-Gens nicht abgeschlossen werden. Die nun unternommene vollständige Sequenzanalyse zeigte, dass *kpp4* im *U. maydis*-Stamm RK32 (*a1 b3*) einen 4698 bp (*base pairs*) langen offenen Leserahmen (ORF, *open reading frame*) umfasst (Genbank Nummer: AF542505). Die abgeleitete Aminosäuresequenz des Genprodukts Kpp4 besteht daher aus 1566 Aminosäuren (aa, *amino acids*). In den *U. maydis* Stämmen FB1 (*a1 b1*) sowie FB2 (*a2 b2*) hingegen hat der ORF von *kpp4* eine Länge von 4704 bp und kodiert für ein Polypeptid von 1568 aa. Diese Unterschiede sind auf eine verschieden häufige Wiederholung des Sequenzmotivs GGCTGC an Position 4438 bp zurückzuführen. Dieses Motiv, das in *kpp4* hintereinander für zwei Alanine kodiert, findet man in FB1 und FB2 sechsmal, in RK32 aber nur fünfmal wiederholt.

Um eine Aussage über die Expression von *kpp4* zu erlangen, wurden Northern-Analysen anhand von haploiden und diploiden Stämmen, die in Flüssig-, sowie auf Festmedium gewachsen waren, durchgeführt. In keiner dieser Untersuchungen konnte ein *kpp4*-spezifisches Transkript nachgewiesen werden. Zudem war es auch nicht möglich, cDNAs von *kpp4* aus verschiedenen cDNA-Banken von *U. maydis* zu isolieren. Mit Hilfe von RT-PCR (RT steht für *reverse transcription*) konnten hingegen alle Bereiche der *kpp4*-mRNA nachgewiesen werden (siehe Material und Methoden, Abschnitt 4.1.7). Dabei zeigte sich, dass *kpp4* ein Intron-freies Gen ist, dessen Transkriptionsstartstelle vor Position -70 bp liegen muss.

Typischerweise kann man MAPKK-Kinasen in eine regulatorische Domäne im N-terminalen Bereich und eine katalytische Domäne im C-Terminus unterteilen. Die regulatorische Domäne übernimmt dabei eine auto-inhibierende Funktion (Tu *et al.*, 1997). Die Analyse von Kpp4 mit ISREC ([http://hits.isb-sib.ch/cgi-bin/hits\\_motifscan](http://hits.isb-sib.ch/cgi-bin/hits_motifscan)) ergab, dass die katalytische Domäne den Aminosäurenbereich von 1104 - 1380 umfasst und daher die regulatorische Domäne maximal die ersten 1103 aa beinhaltet (Abb. 8A). Die Proteinsequenz der Kinasedomäne von Kpp4 zeigte hohe Identität zu denen bekannter pilzlicher MAPKKK, insbesondere sind dabei Ste11 $\alpha$  und Ste11a aus *C. neoformans* (je 69 % Identität), Ste11C aus *Aspergillus nidulans* (60 %), Byr2 aus *S. pombe* (60 %) und Ste11p aus *S. cerevisiae* (50 %) zu nennen. Eine phylogenetische Analyse machte deutlich, dass Kpp4 in der Gruppe der so genannten Pheromon-MAPKKK (Caffrey *et al.*, 1999) liegt, wobei die Proteine der Basidiomyceten *Pneumocystis carinii*, *U. maydis* und *C. neoformans* eine Untergruppe ausbilden (Abb. 8B). Die Bezeichnung Pheromon-MAPKKK wurde dieser Gruppe aufgrund der Funktionen ihrer zugehörigen Proteine zugewiesen: In den heterothallischen Ascomyceten *S. cerevisiae* und *S. pombe* sind STE11p bzw. Byr2 an der Weiterleitung des Pheromonsignals beteiligt und ihre Deletion führt zur Sterilität (Rhodes *et al.*, 1990; Wang *et al.*, 1991). Auch in dem homothallischen Ascomycet *A. nidulans* wird die MAPKKK SteC für die sexuelle Entwicklung benötigt (Wei *et al.*, 2003). Interessanterweise sind die Gene *STE11a* und *STE11 $\alpha$*  in dem human-pathogenen Basidiomycet *C. neoformans* kreuzungstypspezifisch und liegen im *MATa*- bzw. *MAT $\alpha$* -Locus (Lengeler *et al.*, 2002). Es wurde gezeigt, dass *STE11a* für die Fertilität, aber nicht für die Pathogenität des Pilzes entscheidend ist (Clarke *et al.*, 2001).

Kennzeichnend für Mitglieder dieser MAPKKK-Familie sind die konservierten Protein-Protein Interaktionsdomänen RA (*Ras-association*) und SAM (*sterile-alpha-motif*), die zumeist einzeln, aber auch gemeinsam in den regulatorischen Domänen zu finden sind (Abb. 8A). RA-Domänen wurden beschrieben, Interaktionen mit kleinen G-Proteinen der Ras-Familie zu ermöglichen (Ponting und Benjamin, 1996), die SAM-Domäne vermittelt hingegen hetero- und homotypische Proteininteraktion (Peterson *et al.*, 1997; Ponting, 1995; Schultz *et al.*, 1997). Auch in dem vermutlich regulatorischen Bereich von Kpp4 identifizierte ISREC eine RA- (aa 446 - 555) und eine SAM-Domäne (aa 59 - 122). Beide Domänen be-

finden sich auch in Byr2 aus *S. pombe* sowie SteC aus *A. nidulans* (Abb. 8A). Für Byr2 ist gezeigt worden, dass beide Domänen der spezifischen Interaktion mit Ras1 bzw. Ste4 dienen und dabei eine wichtige Rolle bei der Aktivierung der Kinase spielen (Barr *et al.*, 1996; Tu *et al.*, 1997; Xu *et al.*, 1994).



**Abbildung 8: Kpp4 repräsentiert eine MAPKKK und kann der Familie der Pheromon-MAPKKK zugeordnet werden.** A) Schematische Darstellung von Kpp4 und anderer pilzlicher MAPKKK: Die Zahlen entsprechen den Aminosäurepositionen und die dargestellten Domänen wurden mit ISREC ([http://hits.isb-sib.ch/cgi-bin/hits\\_motifscan](http://hits.isb-sib.ch/cgi-bin/hits_motifscan)) identifiziert. Abkürzungen und Annotationen: SAM-Domäne (PS505105); RA-Domäne (PS50200); Kinasedomäne (PS00011); Kpp4 (AAN63948) und Ubc4 (AAF86841) von *U. maydis*, Ste11a (AAN75612) und Ste11α (AAG30205) von *C. neoformans*, Mekk1 (AAG30572) von *P. carinii*, Nrc-1 (AAC21676) von *Neurospora crassa*, Byr2 (P28829) von *S. pombe*, SteC (CAD44493) von *A. nidulans* und Ste11p (S51350) von *S. cerevisiae*. B) Phylogenetische Analyse der Kinasedomäne von Kpp4: Die Kinasedomänen der angegebenen Proteine (aus A) und zusätzlich Ssk2p (S59801; aa 1266 - 1558), Ssk22p (NP\_009998; aa 1034 - 1310), Bck1p (S20117; aa 1175 - 1440)) wurden mit dem Computerprogramm ClustalW 1.5 (Thompson *et al.*, 1994) verglichen und darauf eine phylogenetische Analyse mit dem Bootstrap-Verfahren in 1000 Wiederholungen durchgeführt. Die Zahlen an den Verzweigungen geben die Prozentzahl an, wie häufig eine Verzweigung berechnet wurde. Werte über 50 sind dabei vertrauenswürdig. Die MAPKKK-Familien sind angelehnt an Caffrey *et al.*, (1999): ① steht für die Pheromon-, ② für die Hypo-Osmolarität- und ③ für die Hyper-Osmolarität-Gruppe.

Während der Durchführung dieser Arbeit wurde in *U. maydis* von Andrews *et al.* (2000) das Gen *ubc4* isoliert, da es eine Mutation komplementierte, die den filamentösen Phänotyp einer Adenylatzyklase-Mutante supprimierte. Obwohl die Nukleotidsequenzen von *ubc4* und *kpp4* nahezu identisch sind, wurden dem ORF von *ubc4* nur 3498 bp zugewiesen, und das abgeleitete Polypeptid Ubc4 ist nach 34 aa mit den Aminosäuren 441 - 1567 von Kpp4 identisch. *ubc4* und *kpp4* repräsentieren damit das selbe Gen, dem abgeleiteten Ubc4 fehlte aber

der N-terminale Bereich, der in Kpp4 die SAM-Domäne beinhaltet (Abb. 8A). Da der in dieser Arbeit vorgestellte ORF von *kpp4* anhand verschiedener cDNA-Sequenzen bestätigt werden konnte, ist es wahrscheinlich, dass die Missidentifikation des Startcodons in *ubc4* auf Sequenzfehler zurückzuführen ist.

### 2.1.2 Der Verlust von *kpp4* beeinträchtigt *a*-abhängige Prä- und Postfusionsprozesse

Um Einblick in die Aufgaben zu erlangen, die *kpp4* während des Kreuzungsprozesses ausübt, wurden *kpp4*-Deletionsmutanten hergestellt und auf ihre Paarungskompetenz hin untersucht. Hierfür wurde der ORF von *kpp4* in den kompatiblen Wildtypstämmen FB1 (*a1 b1*) und FB2 (*a2 b2*) deletiert und durch eine Hygromycin-Resistenzkassette ersetzt. Die entsprechenden Deletionsmutanten FB1 $\Delta$ *kpp4* und FB2 $\Delta$ *kpp4* waren in Bezug auf Wachstum und Zellmorphologie von den Ausgangsstämmen nicht zu unterscheiden (nicht gezeigt). Auf Aktivkohle-haltigen Vollmediumplatten wurde anschließend die Paarungskompetenz der Deletionsmutanten untersucht. In diesem Test erscheint das Dikaryon, das aus einer erfolgreichen Fusion zweier kompatibler Sporidien hervorgeht, als weißliches Mycel. Dieses Erscheinungsbild wird auch als Fuz<sup>+</sup>-Phänotyp bezeichnet. Wie erwartet entwickelte eine Mischung von FB1 (*a1 b1*) und FB2 (*a2 b2*) in diesem Test einen starken Fuz<sup>+</sup>-Phänotyp (Abb. 9A). Die Kreuzung von FB2 $\Delta$ *kpp4* mit dem Wildtypstamm FB1 wies hingegen eine leicht verminderte Ausbildung des weißlichen Luftmycels auf (Abb. 9A). Kreuzte man die kompatiblen *kpp4*-Deletionsstämme miteinander, war die Ausbildung von Dikaryen nicht erkennbar (Abb. 9A). Die Deletion von *kpp4* beeinträchtigt also die Dikaryenbildung.

Die Ausbildung eines Dikaryons wird von den Genen der *a*- und *b*-Loci kontrolliert. Dabei reguliert das Pheromon/Rezeptor-System die Ausbildung von Konjugationshyphen und nach der Fusion die Expression der *b*-Gene, die das filamentöse Wachstum des Dikaryons auslösen (Snetselaar *et al.*, 1996; Banuett und Herskowitz, 1989; Bölker *et al.*, 1992; Spellig *et al.*, 1994; Urban *et al.*, 1996b). Um zu untersuchen, an welchen dieser Prozesse *kpp4* beteiligt ist, wurde zunächst die morphologische Antwort auf Pheromonstimulus, die Ausbildung von Konjugationshyphen, untersucht. In diesen Experimenten wurden der Wildtypstamm FB1 sowie FB1 $\Delta$ *kpp4* 5 h mit synthetischem *a2*-Pheromon behandelt. Auf diesen Pheromon-

**Tabelle 2: Konjugationshyphenbildung<sup>a</sup>**

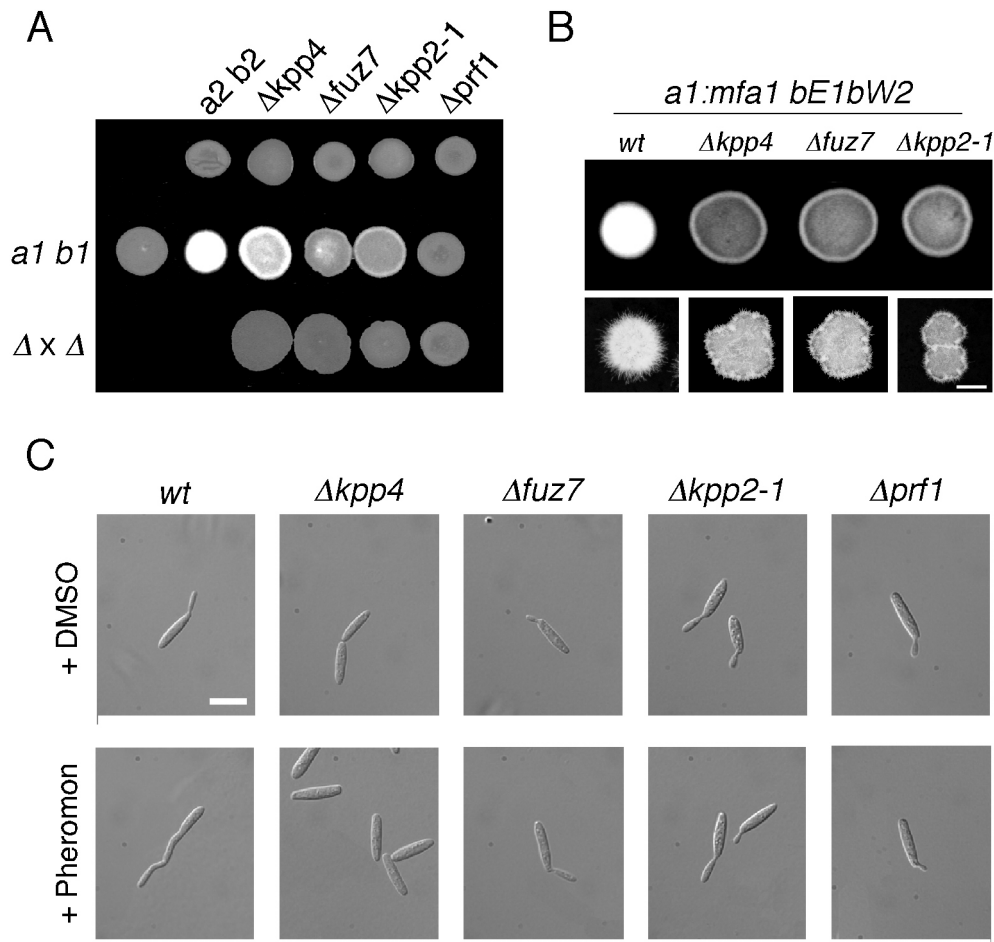
Stamm	Anzahl der Zellen	Konjugationshyphenbildung in %
FB1	506	80
FB1 $\Delta$ <i>kpp4</i>	503	0
FB1 $\Delta$ <i>fuz7</i>	508	0
FB1 $\Delta$ <i>kpp2-1</i>	546	0
FB1 $\Delta$ <i>prf1</i>	550	0

<sup>a</sup>Die Zellen wurden 5 h mit synthetischem *a2*-Pheromon behandelt und die Konjugationshyphenbildung wurde mittels Mikroskopie bestimmt.

stimulus bildeten ca. 80 % der FB1-Zellen Konjugationshyphen, die Zellen des Stammes FB1 $\Delta$ *kpp4* reagierten hingegen nicht (Abb. 9C; Tabelle 2).

Um den Einfluss von *kpp4* auf Postfusionsprozesse zu untersuchen, wurde *kpp4* in dem haploiden Stamm SG200 (*a1:mfa2 bE1bW2*) deletiert. SG200

trägt neben einem aktiven *b*-Locus (*bE1bW2*), ein in den *a1*-Locus inseriertes Pheromongen des *a2*-Locus (*mfa2*). SG200 ist daher zu einer autokrinen Pheromonstimulation befähigt und wächst auf Aktivkohle-haltigen Agarplatten filamentös (Abb. 9B). Die Mutante SG200 $\Delta$ kpp4 hingegen zeigt auf diesen Platten eine stark reduzierte Filamentbildung (Abb. 9B).



**Abbildung 9: Kreuzungsverhalten, Filamentbildung und Konjugationshyphenbildung von  $\Delta$ kpp4-Mutanten.** **A)** Die oben angegebenen Stämme sind FB2 (*a2 b2*) und Derivate. Sie wurden entweder alleine (obere Reihe), mit FB1 (*a1 b1*; mittlere Reihe) oder mit der jeweiligen kompatiblen Mutante (untere Reihe) auf PD-Aktivkohle-Festmedium aufgetropft und 48 h bei 28°C inkubiert. **B)** SG200 (*wt*) und oben angegebene Derivate wurden alleine auf PD-Aktivkohle-Festmedium aufgetropft (obere Reihe) oder zu Einzelkolonien ausgestrichen (untere Reihe) und nach 48 h bei 28°C photographiert. Der Größenstandard in der unteren Reihe entspricht 500  $\mu$ m. **C)** Die oben angegebenen Stämme, FB1 (*wt*) und Derivate, wurden mit 2,5  $\mu$ g/ml synthetischem *a2*-Pheromon (untere Reihe) oder entsprechender Menge DMSO (obere Reihe) 5 h bei 28°C bei leichtem Rotieren inkubiert. Der Größenstandard entspricht 10  $\mu$ m und bezieht sich auf alle Bilder.

Zusammenfassend lassen diese Ergebnisse den Schluss zu, dass *kpp4* an der Regulation von Prä- und Postfusionsprozessen beteiligt ist. Insbesondere kann man festhalten, dass *kpp4* für die Ausbildung von Konjugationshyphen essenziell ist. Damit ähneln  $\Delta$ kpp4-Stämme *fuz7*- sowie *kpp2*-Deletionsmutanten. Diese Mutanten zeigen ebenfalls eine reduzierte

Paarungskompetenz und sind nicht in der Lage, Konjugationshyphen auszubilden (Abb. 9A und C, sowie Tabelle 2; Banuett und Herskowitz, 1994a; Mayorga und Gold, 1999; Müller *et al.*, 1999). Außerdem wird auch die Fähigkeit von SG200, Filamente auszubilden, durch die Deletion von *fuz7* oder *kpp2* stark reduziert (Abb. 9B). Da *kpp4*, *fuz7* und *kpp2* je für ein Mitglied einer MAPK-Kaskade kodieren – *kpp4* für eine MAPKKK, *fuz7* für eine MAPKK und *kpp2* für eine MAPK – lassen diese Beobachtungen vermuten, dass sie Komponenten einer Signalkaskade sind, die für die zelluläre Pheromonantwort wichtig ist.

### 2.1.3 Epistasis-Analyse zwischen *kpp4*, *fuz7*, *kpp2* und *prf1*

Die ähnlichen Phänotypen der *kpp4*-, *fuz7*- und *kpp2*-Deletionsmutanten wiesen darauf hin, dass sie in einer Kaskade liegen. Diese Hypothese wurde nun mit Hilfe so genannter Epistasis-Analysen überprüft. Die Epistasis-Analyse ist eine Methode der klassischen Genetik und untersucht, ob ein Phänotyp, der durch den Einfluss eines Gens verursacht wird, durch den eines anderen nicht-allelischen Gens maskiert werden kann (Bateson, 1909). In Bezug auf biochemische Kaskaden, wie z.B. Biosynthese- und Signalkaskaden, ermöglicht diese Methode somit die Einordnung verschiedener Gene in definierte Kaskaden. Mit Hilfe der Kombination von so genannten „gain-of-function“-Allelen, die z.B. für konstitutiv-aktive Enzyme kodieren, mit „loss-of-function“-Allelen, die kein funktionelles Gen darstellen, kann die Reihenfolge der verschiedenen Genprodukte in einer Kaskade schnell und einfach bestimmt werden. In regulatorischen Wegen, bei denen das eine Genprodukt die Aktivität eines nachfolgenden reguliert, wird das darüber liegende *epistatisch* und das nachfolgende *hypostatisch* genannt. Als klassisches Beispiel sei hier auf die Analysen von Anderson *et al.* (1985) verwiesen, in der die Kaskade definiert werden konnte, die die Ausbildung der dorso-ventralen Körperachse der Fruchtfliege *Drosophila melanogaster* reguliert.

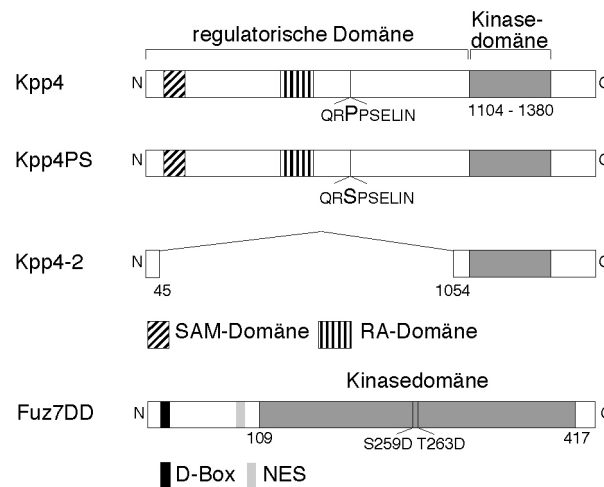
Um das Verhältnis der Gene *kpp4*, *fuz7* und *kpp2* anhand einer Epistasis-Analyse zu untersuchen, wurden im ersten Schritt „gain-of-function“-Allele von *kpp4* sowie *fuz7* erzeugt. Diese Allele werden im Folgenden dominant-aktiv genannt, da sie der kodierenden Kinase eine Aktivität verleihen, die unabhängig von den aktivierenden Signalen ist.

Für *kpp4* wurden analog zu bekannten „gain-of-function“-Mutationen in *STE11* von *S. cerevisiae* (Cairns *et al.*, 1992; Stevenson *et al.*, 1992), folgende dominant-aktive Allele hergestellt: *kpp4PS* besitzt eine Punktmutation, die den Aminosäureaustausch P681S zur Folge hat; *kpp4-2* kodiert für ein verkürztes Protein, das einen Großteil der regulatorischen Domäne verloren hat (Abb. 10). Um ein dominant-aktives Allel von *fuz7* (*fuz7DD*) herzustellen, wurden in *fuz7* zwei Punktmutationen eingeführt, die zu den Aminosäuresubstitutionen S259D und T263D führen (Abb. 10).

Diese Mutationen betreffen zwei in MAPKK hoch konservierte Aminosäuren (Serin oder Threonin), die im allgemeinen von MAPKKK phosphoryliert werden (Alessi *et al.*, 1994; Mansour *et al.*, 1996; Zheng und Guan, 1994). Das Einfügen negativer Ladungen (z.B. durch



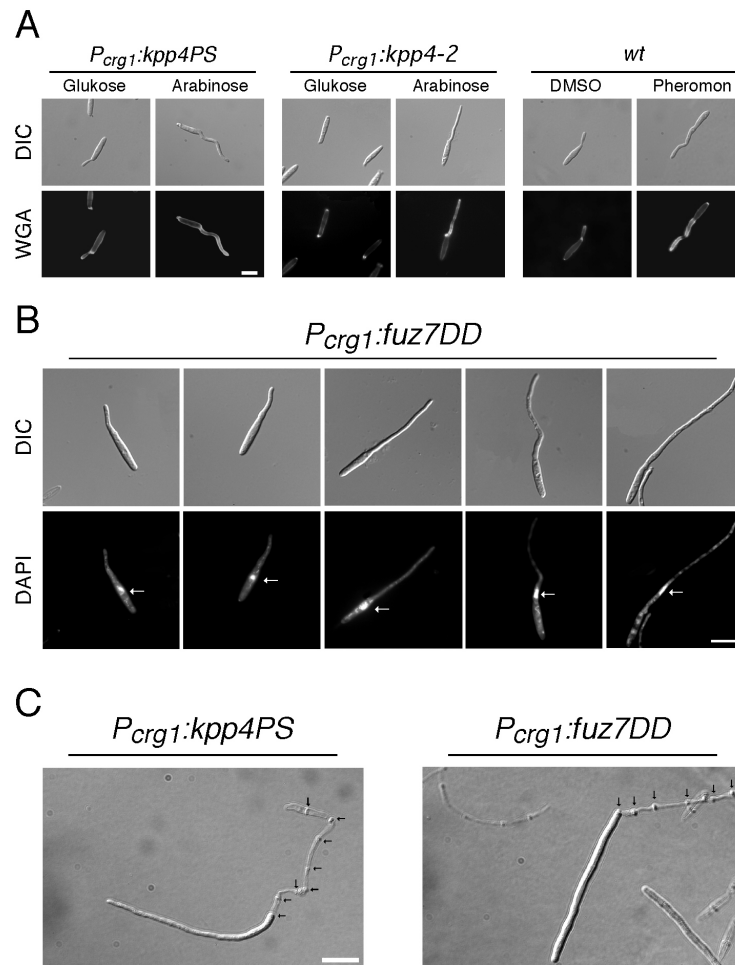
Aspartat) an diesen Positionen simuliert wahrscheinlich eine Phosphorylierung und kann dabei die Aktivität der MAPKK mehr als 100-fach erhöhen (Huang und Erikson, 1994).



**Abbildung 10: Schematische Darstellung der konstitutiv-aktiven Proteine Kpp4PS, Kpp4-2 und Fuz7DD.** Kpp4PS besitzt den Aminosäureaustausch P681S in einem konservierten Bereich der regulatorischen Domäne, der „catalytic binding domain of Ste11p like kinases“. In Kpp4-2 ist der größte Teil der regulatorischen Domäne von Aminosäure 45 - 1054 deletiert. Fuz7DD (insgesamt 435 aa) trägt zwei Aminosäureaustausche S259D und T263D in dem konservierten Phosphorylierungsmotiv. Zusätzlich befindet sich im N-Terminus von Fuz7 eine putative D-Box (13 – 21 aa), von denen bekannt ist, dass sie Interaktionen mit MAPK vermitteln (Bardwell *et al.*, 2001), sowie eine prototypische, putative NES (*nuclear export sequence*, LxxxLxxLxL, 87 – 96 aa; Macara, 2001).

### 2.1.3.1 Die Expression von *kpp4PS*, *kpp4-2* und *fuz7DD* führt zu der Ausbildung von Filamenten

Um *kpp4-2*, *kpp4PS* und *fuz7DD* kontrolliert in *U. maydis* zu exprimieren, wurden diese Allele unter Kontrolle des regulierbaren Promotors des Arabinasegens *crg1* ( $P_{crg1}$ ) gesetzt, dessen Aktivität durch Glukose unterdrückt und durch Arabinose induziert werden kann (Bottin *et al.*, 1996; Brachmann *et al.*, 2001). Um eine vergleichbare Expressionsstärke zu gewährleisten, wurden alle Konstrukte in einfacher Kopie in den *ip*-Locus (Loubradou *et al.*, 2001) des Stamms FB1 (*al b1*) eingeführt. In Glukose-haltigem Medium waren die resultierenden Stämme FB1 $P_{crg1}$ :*kpp4-2*, FB1 $P_{crg1}$ :*kpp4PS* (Abb. 4A) sowie FB1 $P_{crg1}$ :*fuz7DD* (nicht gezeigt) in ihrer Zellmorphologie von den Ausgangsstämmen nicht zu unterscheiden. Vier Stunden nach Transfer in Medium, das Arabinose als einzige Kohlenstoffquelle enthielt, entwickelten alle drei Stämme an einem oder beiden Polen der Zellen irreguläre Filamente (Abb. 11A und B).



**Abbildung 11: Die Expression von *kpp4-2*, *kpp4PS* oder *fuz7DD* stimuliert die Ausbildung von Konjugationshyphen-ähnlichen Filamenten.** **A)** DIC- (obere Reihe) sowie Epifluoreszenz- (untere Reihe) Aufnahmen von FB1 (*wt*, rechte Spalte) und Derivate. Die Zellwand wurde mit WGA-TRITC angefärbt. Die *P<sub>crg1</sub>:kpp4-2*- und *P<sub>crg1</sub>:kpp4PS*-Stämme wuchsen in Anwesenheit von Glukose und 5 h in Arabinose-haltigem Medium. FB1 wurde 5 h mit DMSO oder 2,5 μg/ml α2-Pheromon inkubiert. Alle Aufnahmen wurden mit derselben Vergrößerung aufgenommen und der Größenstandard entspricht 10 μm. **B)** Indirekte Kernfärbung (Pfeile) durch DAPI in FB1 *P<sub>crg1</sub>:fuz7DD*, gewachsen in Arabinose-haltigem Medium. DIC- (obere Reihe) und Epifluoreszenz- (untere Reihe) Aufnahmen gleicher Vergrößerung (Größenstandard entspricht 10 μm). **C)** Die oben angegebenen Stämme wuchsen 24 h in Arabinose-haltigem Medium. Die wachsenden Filamente hinterlassen leere Abschnitte, die durch Septen (Pfeile) getrennt werden. Der Größenstandard entspricht 10 μm.

Aufgrund ihres morphologischen Erscheinungsbildes erinnern diese Filamente an Konjugationshyphen (Abb. 11A), die bereits 1932 als Wirrfäden beschrieben wurden (Bauch, 1932).

Um diese Filamente näher zu untersuchen, wurden daher bekannte Merkmale von Konjugationshyphen herangezogen. Auswachsende Konjugationshyphen können im Gegensatz zu knospenden Zellen und b-abhängigen Filamenten, die nur an der Spitze gefärbt werden, über die gesamte Länge mit TRITC-gekoppeltem WGA (*wheat germ agglutinin*) markiert werden (Abb. 11A; Z. Szabó, persönliche Mitteilung). WGA bindet spezifisch an freie Enden von

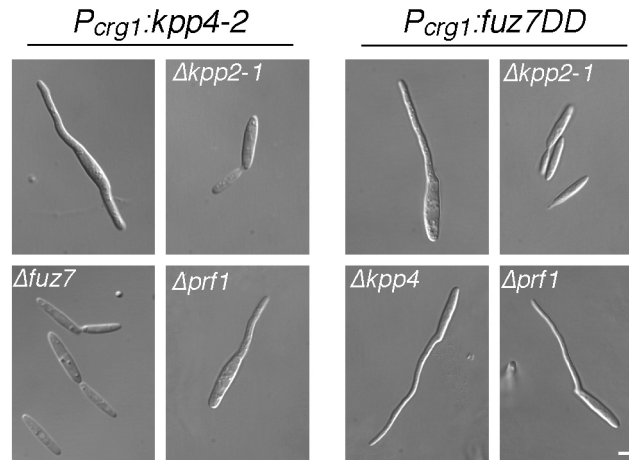
kurzen Chitinketten, die in der pilzlichen Zellwand an Stellen des aktiven Wachstums zu finden sind (Nagata und Burger, 1974). Die durch *kpp4PS*-, *kpp4-2*- oder *fuz7DD*-induzierten Filamente zeigen ein mit Konjugationshyphen vergleichbares WGA-Färbungsmuster (in Abb. 11A, gezeigt für  $FB1P_{crg1}:kpp4PS$  und  $FB1P_{crg1}:kpp4-2$ ). Als weiteres Kriterium diente die Beobachtung, dass Zellen, die Konjugationshyphen ausbilden, aufgrund eines Zellzyklusarrests nur einen Zellkern besitzen (J. Perez-Martin, persönliche Mitteilung; Banuett und Herskowitz, 1994b). Daher wurden von  $FB1P_{crg1}:fuz7DD$ -Zellen, die 4 h in Arabinosehaltigem Medium gewachsen sind, Zellaliquots entnommen und mit dem DNA-spezifischen DAPI-Farbstoff behandelt, der Zellkerne sowie Mitochondrien markiert. Es zeigte sich, dass pro Filament nur ein Zellkern vorlag (Abb. 11B). Auch nach 8 - 10 h Inkubation in Medium mit Arabinose konnte nur ein Zellkern pro Hyphe nachgewiesen werden (nicht gezeigt). Dies lässt vermuten, dass eine aktivierte MAPK-Kaskade den Zellzyklus arretieren kann. Interessanterweise konnte beobachtet werden, dass der Zellkern bis zu einer Filamentlänge von  $4,0 \pm 1,2 \mu m$  ( $n = 5$ ) in seiner zentralen Position gehalten wird und sich bei einer Filamentlänge von  $8,6 \pm 0,9 \mu m$  ( $n = 5$ ) bis zu  $15,0 \pm 0,4 \mu m$  ( $n = 5$ ) zwischen der zentralen Position und dem Filamentanfang befindet. Ab einer Filamentlänge von  $24,4 \pm 1,4 \mu m$  ( $n = 5$ ) war er ausschließlich in diesem zu finden (Beispiele siehe Abb. 11B). Nach 24 h Inkubation in Medium mit Arabinose wuchsen  $FB1P_{crg1}:kpp4PS$  und  $FB1P_{crg1}:fuz7DD$  weiterhin nur an einem Pol und bildeten Filamente von einer Länge von  $50,6 \pm 3 \mu m$  ( $n = 5$ ). Diese Filamente hinterließen leere Abschnitte, die kein Zytoplasma enthielten und durch Septen getrennt waren (Abb. 11C). Eine solche Ausbildung von Septen wurde auch bei Konjugationshyphen beobachtet, die lange mit Pheromon stimuliert wurden (Z. Szabó, persönliche Mitteilung). Zusammenfassend kann man festhalten, dass *kpp4-2*, *kpp4PS* oder *fuz7DD* Filamente induzieren können, die Eigenschaften von Konjugationshyphen aufweisen.

### 2.1.3.2 *kpp4*, *fuz7* und *kpp2* liegen in einer Kaskade

Da sich der morphologische Wechsel, der durch die Expression von *kpp4-2*, *kpp4PS* oder *fuz7DD* ausgelöst wurde, sehr gut als phänotypischer Marker für die Epistasisuntersuchungen eignete, wurden  $P_{crg1}:kpp4-2$  in *fuz7*-, *kpp2*-, sowie *prf1*-Deletionsmutanten, und  $P_{crg1}:fuz7DD$  in *kpp4*-, *kpp2*- sowie *prf1*-Deletionsmutanten eingebracht. Vier Stunden nach Inkubation in Arabinosehaltigem Medium teilten sich die Stämme  $FB1\Delta fuz7P_{crg1}:kpp4-2$  und  $FB1\Delta kpp2-1P_{crg1}:kpp4-2$  weiterhin durch Ausbildung von Knospen (Abb. 12, linke Hälfte). Die Fähigkeit von *fuz7DD* den morphologischen Wechsel zu induzieren war abhängig von *kpp2*, aber unabhängig von *kpp4* (Abb. 12, rechte Hälfte). Diese Ergebnisse demonstrieren, dass diese drei Komponenten in einem Signalweg liegen und Fuz7 unterhalb von Kpp4 und oberhalb von Kpp2 agiert.

Überraschenderweise bildeten sowohl  $FB1\Delta prf1P_{crg1}:kpp4-2$ , als auch  $FB1\Delta prf1P_{crg1}:fuz7DD$  in Arabinosehaltigem Medium Filamente aus (Abb. 12). Das bedeutet, dass der Trans-

kriptionsfaktor Prf1, der sowohl die basale als auch induzierte Expression der *a*- und *b*-Gene reguliert, für diesen morphologischen Wechsel nicht benötigt wird.

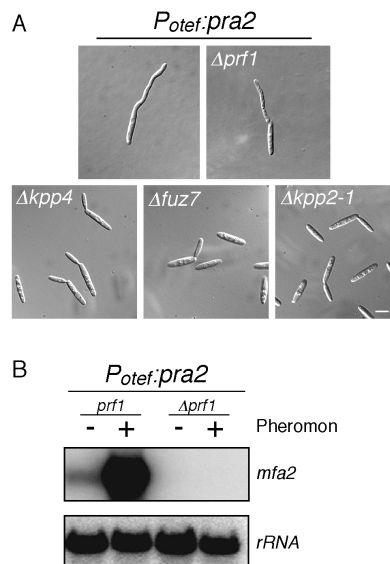


**Abbildung 12: Kpp4, Fuz7 und Kpp2 liegen in einer Kaskade.** FB1-Derivate, die entweder *kpp4-2* (linke Spalte) oder *fuz7DD* (rechte Spalte) exprimieren tragen zusätzlich die im jeweiligen Bild angegebene Gendelektion. Alle Stämme wuchsen 5 h in Arabinose-haltigem Medium. Der Größenstandard entspricht 5 µm.

### 2.1.3.3 Prf1 wird für die Ausbildung von Konjugationshyphen nicht benötigt

Die Epistasisisuntersuchungen hatten gezeigt, dass Kpp4, Fuz7 und Kpp2 in einer MAPK-Kaskade liegen, die im aktiven Zustand die Ausbildung von Filamenten induziert, die Eigenschaften von Konjugationshyphen aufweisen (siehe 2.1.3.1). Daher lag es nahe zu vermuten, dass eine genetische Aktivierung der Kaskade durch *kpp4-2* oder *fuz7DD* einem Pheromonstimulus entspricht. Zwischen beiden Prozessen bestand aber ein deutlicher Unterschied: Während *prf1* für den von *fuz7DD* und *kpp4-2* ausgelösten morphologischen Wechsel nicht benötigt wird, waren *prf1*-Deletionsmutanten nicht in der Lage, Konjugationshyphen auszubilden (siehe Abb. 9C und Tabelle 2). Prf1 ist jedoch für die basale und induzierte Transkription der *a*-Gene verantwortlich. Daher exprimieren  $\Delta prf1$ -Stämme weder Pheromon noch Pheromonrezeptor und sind damit „blind“ gegenüber Pheromon (Hartmann *et al.*, 1996). Wenn diese Insensibilität der  $\Delta prf1$ -Mutanten ursächlich für das Ausbleiben der Konjugationshyphenbildung ist, sollte eine ektopische Expression des Pheromonrezeptors diesen Defekt aufheben können. Daher wurde *pra2*, das für den Pheromonrezeptor des *a2*-Locus kodiert, unter Kontrolle des konstitutiv-aktiven *otef*-Promotors (Spellig *et al.*, 1996) in den *ip*-Locus von FB2 $\Delta prf1$  und auf gleiche Weise in FB2, FB2 $\Delta kpp4$ , FB2 $\Delta fuz7$ , sowie FB2 $\Delta kpp2-1$  eingebracht. Alle so hergestellten Stämme zeigten ein hohes *pra2*-Transkriptionsniveau (nicht gezeigt). Nach Stimulation mit synthetischem *a1*-Pheromon bildeten FB2*pra2* und FB2*pra2* $\Delta prf1$  Konjugationshyphen aus (Abb. 13A). Dies zeigt, dass Prf1 nicht direkt an der Regulation der morphologischen Antwort beteiligt ist, sondern für die Expression des

Rezeptors essenziell ist. Im Gegensatz dazu reagierten weder FB2pra2 $\Delta$ kpp4, FB2pra2 $\Delta$ fuz7 noch FB2pra2 $\Delta$ kpp2-1 auf diesen Pheromonstimulus (Abb. 13A), d.h. diese Komponenten werden für die morphologische Antwort absolut benötigt. Da in bisherigen Experimenten die Konjugationshyphenbildung mit der Pheromon-abhängigen Genexpression koinzidierte,



wurde vor und nach Pheromonstimulation aus FB2pra2 $\Delta$ prf1 und FB2pra2 RNA isoliert und das Expressionsniveau des Pheromogens *mfa2* mit Hilfe einer Northern-Analyse ermittelt. Es zeigte sich, dass *prf1* auch in dieser Situation sowohl für die basale, als auch Pheromon-induzierte *mfa2*-Transkription essenziell war (Abb. 13B). Somit ist FB2pra2 $\Delta$ prf1 zwar zu der morphologischen, aber nicht zu der transkriptionellen Pheromonantwort befähigt. Zusammenfassend legen diese Ergebnisse nahe, dass die genetische Aktivierung der MAPK-Kaskade mit Hilfe der dominant-aktiven Allele *kpp4-2* und *fuz7DD* einen Pheromonstimulus simulieren kann, der unabhängig von einer Stimulation des Rezeptors ist.

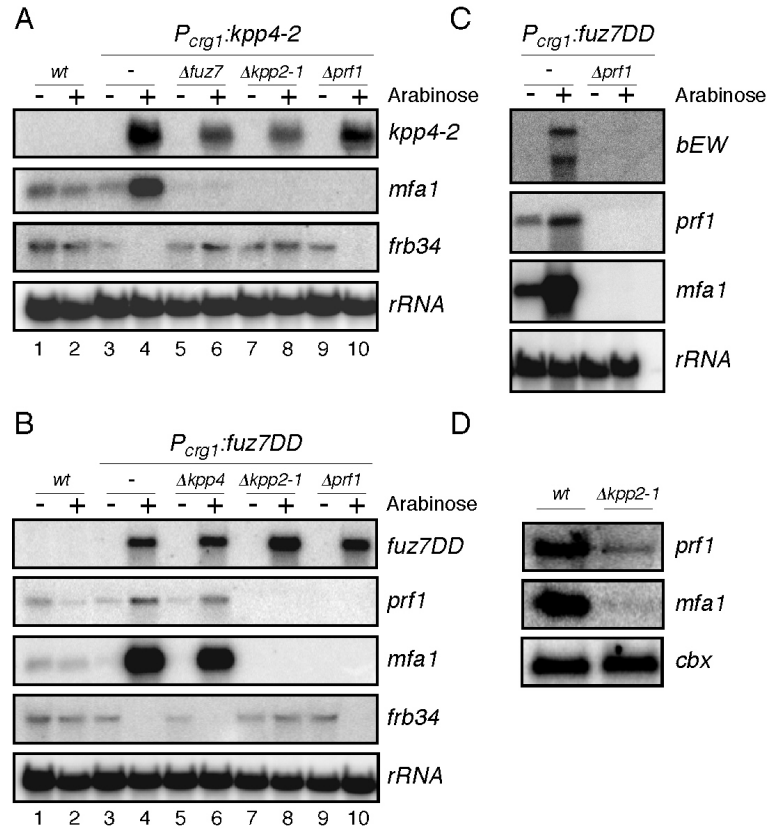
**Abbildung 13: Konstitutive Expression des Pheromonrezeptors Pra2 in  $\Delta$ prf1-Mutanten.** A) FB2pra2 und Derivate, die die im jeweiligen Bild angegebenen Gendelektionen tragen, wurden mit 2,5  $\mu$ g/ml synthetischem *a1*-Pheromon 5 h stimuliert. Der Größenstandard entspricht 5  $\mu$ m. B) Aus FB2pra2 und FB2pra2 $\Delta$ prf1, die 5 h mit DMSO (-) oder synthetischem *a1*-Pheromon (+) behandelt waren, wurde Gesamt-RNA isoliert. Für die Northern-Analyse wurde 10  $\mu$ g Gesamt-RNA pro Spur geladen. Der Filter wurde mit den Sonden *mfa2* und *rRNA* (als Ladekontrolle) hybridisiert.

#### 2.1.3.4 Eine aktivierte MAPK-Kaskade erhöht die Expression von *mfa1* und der *b*-Gene

Wenn die Expression von *kpp4-2* und *fuz7DD* einen Pheromonstimulus entspricht, dann sollten diese dominant-aktiven Allele auch die Expression Pheromon-regulierter Gene (wie z.B. *mfa*) beeinflussen. Dies wurde nun anhand einer Expressionsanalyse untersucht. Dabei zeigte sich, dass sowohl *kpp4-2*, als auch *fuz7DD* die Menge an *mfa1*-mRNA erhöhen kann (Abb. 14A und B, Spuren 3 und 4). In Abwesenheit von *fuz7* oder *kpp2* hingegen, konnte *kpp4-2* die *mfa1*-Transkription nicht mehr stimulieren (Abb. 14A, Spuren 6 und 8). *fuz7DD* benötigte hingegen *kpp2* aber nicht *kpp4*, um eine *mfa1*-Induktion auszulösen (Abb. 14B, Spuren 6 und 8). Untersuchte man die *mfa1*-Expression in FB1 $\Delta$ prf1 $P_{crg1}$ :*kpp4-2* und FB1 $\Delta$ prf1  $P_{crg1}$ :*fuz7DD*, so zeigte sich, dass in beiden Fällen keine Transkripte nachweisbar waren (Abb. 14A und B, Spur 10).

In einer weiteren Northern-Analyse wurde untersucht, ob die aktivierte MAPK-Kaskade auch die Expression der *b*-Gene erhöhen kann. Es stellte sich heraus, dass nach Induktion von

*fuz7DD* in FB1P<sub>crg1</sub>:*fuz7DD* die *b*-Gene, *bE* und *bW*, vermehrt transkribiert wurden und diese Induktion benötigte *prf1* (Abb. 14C). *fuz7DD* stimuliert also die Expression von Genen, die durch Prf1 reguliert werden.



**Abbildung 14: *kpp4-2* sowie *fuz7DD* stimulieren die *a*- und *b*-Genexpression:** 10  $\mu$ g Gesamt-RNA wurde pro Spur geladen und die Filter wurden mit den Sonden, die auf der rechten Seite angegeben sind, hybridisiert. Dabei dienten *rRNA*- (A, B und C), sowie *cbx*- (D) Sonden als Ladekontrolle. **A), B) und C)** FB1 und FB1-Derivate wuchsen in Anwesenheit von Glukose (-) oder 5 h in Arabinose-haltigem Medium (+). **D)** FB1 (*wt*) und FB1 $\Delta$ *kpp2-1* wuchsen 48 h auf Aktivkohle-haltigem Vollmedium bevor die Gesamt-RNA isoliert wurde.

Prf1-vermittelte Genexpression wird durch kurze regulatorische Elemente, so genannte PRE-Boxen, kontrolliert, an die Prf1 direkt binden kann (Hartmann *et al.*, 1996). PRE-Boxen finden sich in den Promotorbereichen der *a*- und *b*-Gene (Urban *et al.*, 1996b). Prf1-Aktivität kann daher direkt mit einem Reporter nachgewiesen werden, in dem *GFP* (kodiert für das *green fluorescent protein*) an ein Basalpromotor fusioniert ist, der unter der Kontrolle von sechs synthetischen PRE-Boxen steht (M. Feldbrügge, persönliche Mitteilung). Dieser Reporter, P<sub>6xPRE</sub>:GFP, wurde auf einem frei-replizierenden Plasmid (pPRE6-GFP) in FB1P<sub>crg1</sub>:*fuz7DD* und FB1 eingebracht. Mit einem Fluorimeter wurde dann die Intensität der GFP-Fluoreszenz von je zwei unabhängigen Transformanten nach 5 h Wachstum in Arabinose-haltigem Medium in vier verschiedenen Versuchen gemessen und es zeigte sich,

dass in FB1P<sub>crg1</sub>:fuz7DD[pPRE6-GFP] die GFP-Fluoreszenz  $42,5 \pm 2,3$ -fach höher war als in FB1[pPRE6-GFP]. Das impliziert eine direkte Beteiligung von Prf1 an der *fuz7DD*-stimulierten Genexpression.

Im *prf1*-Promotor sind ebenfalls 2 PRE-Boxen vorhanden, über die Prf1 wahrscheinlich seine eigene Transkription kontrolliert (Hartmann *et al.*, 1996). Daher sollte *fuz7DD* auch die Expression von *prf1* stimulieren können. In FB1P<sub>crg1</sub>:fuz7DD und FB1Δkpp4P<sub>crg1</sub>:fuz7DD stimulierte *fuz7DD* die *prf1*-Transkription fünffach, in FB1 hingegen führte der Medienwechsel zu einer Halbierung der Menge an *prf1*-Transkripten (Abb. 14B). *fuz7DD* induziert also auch die *prf1*-Expression. Interessanterweise exprimierte FB1Δkpp2-1P<sub>crg1</sub>:fuz7DD weder in Medium mit Glukose noch in Medium mit Arabinose nachweisbare Mengen an *prf1*-Transkripten (Abb. 14B, Spuren 7 und 8). Auch in dem Ausgangsstamm FB1Δkpp2-1 war die *prf1*-Transkription deutlich reduziert (Abb. 14D). Das zeigt, dass *kpp2* einen Einfluss auf die basale Expression von *prf1* hat.

Zusammenfassend zeigen diese Resultate, dass die aktivierte MAPK-Kaskade die Expression aller bekannten *prf1*-regulierten Gene induzieren kann und diese Regulation vermutlich direkt über Prf1 läuft.

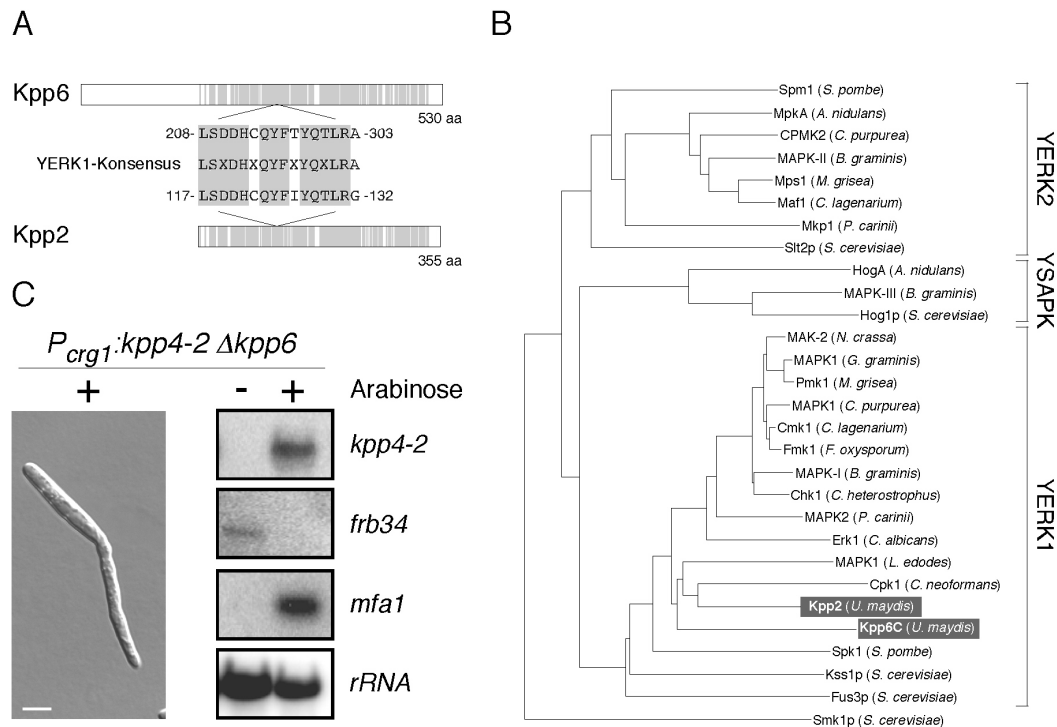
#### **2.1.3.5 Die Kpp4/Fuz7/Kpp2-MAPK-Kaskade reguliert die Expression des Gens *frb34* unabhängig von *prf1***

Im Gegensatz zur Induktion der *a*- und *b*-Gene, für die *prf1* essenziell war, wurde der Transkriptionsfaktor Prf1 für die morphologische Antwort auf *kpp4-2* und *fuz7DD* nicht benötigt. So scheint sich die Kpp4/Fuz7/Kpp2-Signalkette unterhalb von Kpp2 zu verzweigen. In diesem Zusammenhang ist die transkriptionelle Regulation des Gens *frb34*, das für eine Acyl-Transferase kodiert (Brachmann *et al.*, 2001), interessant. Die Expression von *frb34* wurde sowohl durch *kpp4-2* als auch durch *fuz7DD* reprimiert (Abb. 14A und B, Spuren 3 und 4). Da in FB1Δprf1P<sub>crg1</sub>:kpp4-2 und in FB1Δprf1P<sub>crg1</sub>:fuz7DD diese Repression zu beobachtet ist (Abb. 14A und B, Spuren 9 und 10), muss mindestens ein weiterer Transkriptionsfaktor existieren, dessen Aktivität von der MAPK-Kaskade beeinflusst wird.

#### **2.1.3.6 Die Kpp2-ähnliche MAPK Kpp6 agiert nicht unterhalb von Kpp4**

Während diese Arbeit durchgeführt wurde, hat A. Brachmann aus unserer Arbeitsgruppe das Gen *kpp6* isoliert, das für eine Kpp2-ähnliche MAPK kodiert (Brachmann *et al.*, 2003). In der Kinasedomäne zeigen Kpp2 und Kpp6 über 68 % Identität und lassen sich beide derselben Unterfamilie der MAPK zuordnen (Abb. 15A und B). Die YERK1-Familie (YERK1 steht für *Yeast ERK1-like*) ist charakterisiert durch eine Konsensussequenz in der Kinasesubdomäne VI (Abb. 15A, Kültz, 1998). Aufgrund einer zusätzlichen N-terminalen Domäne, der bisher keine Funktion zugeschrieben werden konnte, repräsentiert Kpp6 jedoch eine ungewöhnliche MAPK. Im Gegensatz zu *kpp2*-Mutanten, zeigen aber *kpp6*-Deletionsstämme keinen Defekt

in der Paarungskompetenz (Brachmann *et al.*, 2003). Diese Befunde machten es unwahrscheinlich, dass Kpp6 Teil des Kpp4/Fuz7/Kpp2-Moduls ist. Mit Hilfe der Epistasis-Analyse konnte diese Annahme bestätigt werden: Die Expression von *kpp4-2* stimulierte in *kpp6*-Deletionsmutanten sowohl den morphologischen Wechsel, als auch die *mfa1*-Expression und reprimierte die Transkription von *frb34* (Abb. 15C). In Bezug auf diese Prozesse ist Kpp6 somit nicht Teil des Kpp4/Fuz7/Kpp2-Moduls.



**Abbildung 15: Die MAP-Kinasen Kpp2 und Kpp6.** **A)** Kpp2 und Kpp6 sind zwei eng verwandte MAPK der gleichen Unterfamilie. Die grau unterlegten Bereiche stehen für identische Aminosäurereste. Beide MAP-Kinasen tragen die YERK1-Konsensussequenz entsprechend Kültz (1998). **B)** Ein phylogenetischer Vergleich von Kpp2 und der Kinsedomäne von Kpp6 mit verschiedenen pilzlichen MAP-Kinase. Die MAPK-Familien sind nach Kültz (1998) benannt, YERK1: *Yeast ERK1*; YERK2: *Yeast ERK2* und YSAPK: *Yeast Stress Activated Protein Kinase*. Die Analyse wurde mit ClustalW 1.8 vorgenommen (Thompson *et al.*, 1994). **C)** Epistasis-Analyse zwischen *kpp4* und *kpp6*. FB1P<sub>crg1</sub>:*kpp4-2*Δ*kpp6* wurde in Anwesenheit von Glukose (-) angezogen und 5 h in Arabinose-haltigem Medium (+) inkubiert. Der Größenstandard in der linken Spalte entspricht 5 µm. Die Northern-Analyse erfolgte wie unter Abb. 14A beschrieben. **ad B)** Annotationen: Slp2p (S43737), Kss1p (P14681), Fus3p (P16892), Smk1p (P41808) und Hog1p (S64950) von *S. cerevisiae*; Spm1 (Q92398) und Spk1 (P27638) von *S. pombe*; MpkA (AAD24428) und HogA (AAF81523) von *A. nidulans*; CPMK2 (CAC 87145) und MAPK1 (CAC47939) von *C. purpurea*; MAPK-I (AAG53654), MAPK-II (AAG53655) und MAPK-III (AAL83917) von *Blumeria graminis*; Pmk1 (AAC49521) und Mps1 (AAC63682) von *M. grisea*; Maf1 (AAL50116) und Cmk1 (AAD50496) von *Colletotrichum lagenarium*; Mkp1 (AAD16043) und MAPK2 (AAC27327) von *P. carinii*; Mak-2 (AAK25816) von *N. crassa*, MAPK1 (AAG44657) von *Gaeumannomyces graminis*; Fmk1 (AAG01162) von *Fusarium oxysporum*; Chk1 (AAF05913) von *Cochliobolus heterostrophus*; Erk1 (P28869) von *C. albicans*; MAPK1 (AAF36811) von *Lentinula edodes*; Cpk1 (AAN03694) von *C. neoformans*; Kpp2 (AAF15528) und Kpp6C (AJ505152) von *U. maydis*.



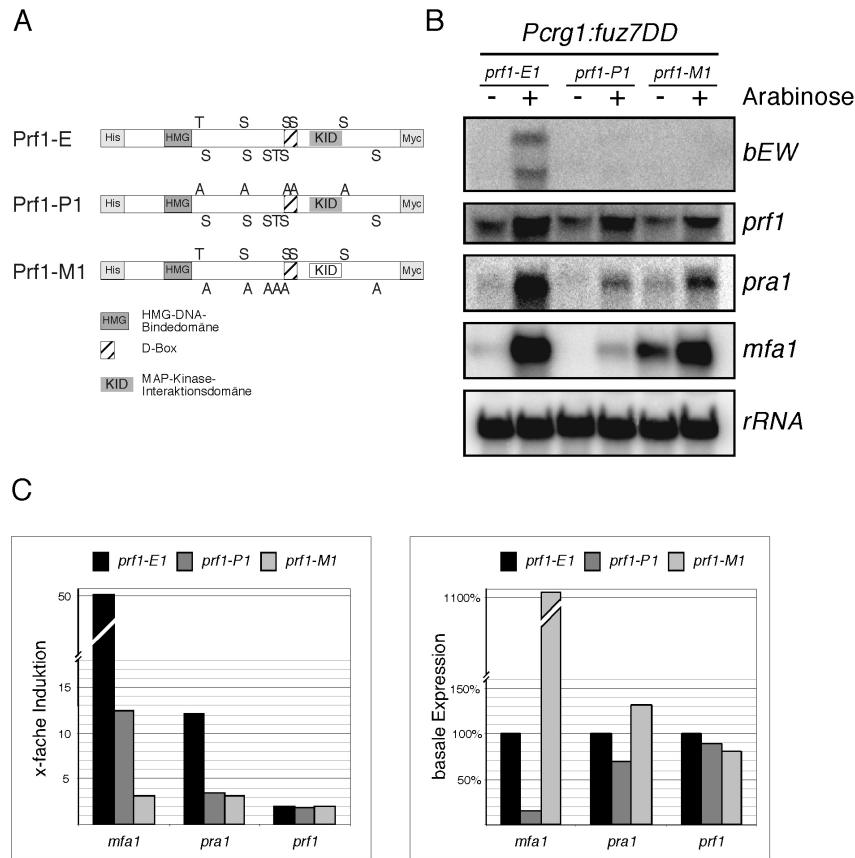
### 2.1.3.7 Auswirkungen der potentiellen MAPK-Phosphorylierungsstellen in Prf1 auf die *fuz7DD*-induzierte Genexpression

Prf1 besitzt sechs verschiedene potentielle MAPK-Phosphorylierungsstellen und zwei mögliche MAPK-Interaktionsdomänen (Abb. 16A). Zusätzlich existieren in Prf1 noch fünf putative Phosphorylierungsstellen für die cAMP-abhängige Proteinkinase A (PKA, Abb. 16A). Es konnte gezeigt werden, dass die postulierten MAPK- und PKA-Phosphorylierungsstellen für die Paarungskompetenz benötigt werden (Müller *et al.*, 1999 und M. Feldbrügge, persönliche Mitteilung). *U. maydis*-Stämme, die eine Prf1-Variante (Prf1-M1) exprimieren, in der alle MAPK-Phosphorylierungsstellen und eine putative MAPK-Interaktionsdomäne (KID) zerstört sind (Abb. 16A), weisen einen ähnlichen Defekt wie *kpp2*-, *fuz7*- oder *kpp4*-Mutanten auf (Müller *et al.*, 1999). Dies ließ vermuten, dass die MAPK Kpp2 Prf1 direkt über diese potentielle MAPK-Phosphorylierungsstellen modifiziert und dadurch die Aktivität von Prf1 beeinflusst. Wenn diese Hypothese zutreffend ist, sollte in einem Stamm, der das mutierte Prf1-M1 exprimiert, die *fuz7DD*-induzierte Genexpression ausbleiben. Daher wurde *P<sub>crg1</sub>:fuz7DD* in FB1-Derivate eingebracht, die entweder *prf1-E1*, *prf1-P1* oder *prf1-M1* anstelle des endogenen *prf1* trugen (M. Feldbrügge, persönliche Mitteilung). Alle drei Allele kodieren für Epitop-markierte Proteine. Prf1-E1 kodiert für das Epitop-markierte Wildtyp-Protein, in Prf1-P1 und in Prf1-M1 sind hingegen alle putativen PKA- bzw. MAPK-Phosphorylierungsstellen mutiert (Abb. 16A).

Die Northern-Analyse zeigte, dass *fuz7DD* funktionelle PKA- und MAPK-Phosphorylierungsstellen in Prf1 benötigt, um die *b*-Genexpression zu stimulieren (Abb. 16B). Überraschenderweise konnte *fuz7DD* in Anwesenheit von *prf1-M1* jedoch sowohl die *mfal*-, als auch die *pral*-Transkription stimulieren (Abb. 16B). Eine Quantifizierung zeigte, dass *fuz7DD* in Anwesenheit von *prf1-M1* die *mfal*-Expression 3-fach induzierte, wohingegen der *prf1-E1*-Stamm mit einer 50-fachen und der *prf1-P1*-Stamm mit einer 12-fachen Stimulation der *mfal*-Transkription reagierte (Abb. 16C). Diese Unterschiede in der Induktionsstärke sind hauptsächlich auf verschiedene Mengen an *mfal*-Transkripten zurückzuführen, die die jeweiligen Stämme in Glukose-haltigem Medium zeigten: Setzt man bei dieser Analyse das *mfal*-Expressionsniveau von FB1prf1-E1P<sub>crg1</sub>:*fuz7DD* auf 100 %, so zeigt der *prf1-P1* Stamm mit nur 15 % eine deutliche Reduktion, FB1prf1-M1P<sub>crg1</sub>:*fuz7DD* dagegen eine über 1100 %-ige Steigerung der Basalexpression (Abb. 16C).

Die quantitative Auswertung der *pral*-Expression zeigte, dass die basale *pral*-Expression in dem *prf1-P1*-Stamm um ca. 30 % reduziert war, wohingegen sie in FB1prf1-M1P<sub>crg1</sub>:*fuz7DD* um ca. 30 % erhöht war (Abb. 16 C). In beiden Mutanten führte die Expression von *fuz7DD* zu einer 3-fachen Induktion der *pral*-Transkription (Abb. 16 B und C). *Fuz7DD* konnte also in Anwesenheit von *prf1-P1* und *prf1-M1* die Expression der *a*-Gene stimulieren, die Expressionsmuster von *mfal* und *pral* waren aber eindeutig unterschiedlich. Interessanterweise

war die basale *prf1*-Expression in allen Stämmen vergleichbar und konnte durch *fuz7DD* etwa 2-fach induziert werden (Abb. 16B und C).

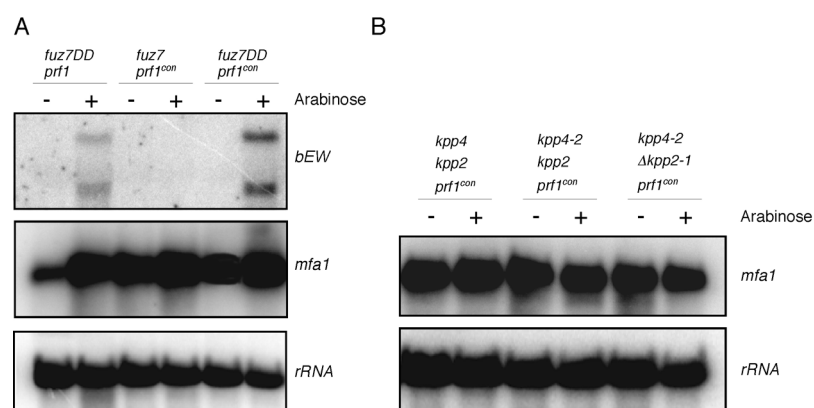


**Abbildung 16: Für die *fuz7DD*-induzierte Genexpression werden die putativen MAPK-Phosphorylierungsstellen in Prf1 benötigt.** **A)** Schematische Darstellung von verschiedenen Prf1-Varianten. Native und mutierte PKA- bzw. MAPK-Phosphorylierungsstellen (Konsensus: RRxS/T bzw. L/PxS/TP) sind über bzw. unter den Varianten dargestellt. Abkürzungen: His, N-terminaler Hexa-Histidin-Tag; Myc, C-terminaler Triple-Myc-Tag; HMG, HMG-Box-DNA-Bindedomäne; D-Box, konservierte MAPK-Interaktionsdomäne; KID, MAPK-Interaktionsdomäne des FXFP-Typs. In Prf1-M1 ist die KID durch vier Aminosäureaustausche verändert (siehe Müller *et al.*, 1999). **B)** Die verschiedenen FB1-Derivate wuchsen in Anwesenheit von Glukose (-) und 5 h in Arabinose-haltigem Medium (+). 10 µg Gesamt-RNA wurde pro Spur geladen und die Filter wurden mit den Sonden, die auf der rechten Seite angegeben sind, hybridisiert. Dabei diente die *rRNA* als Ladekontrolle. **C)** Darstellung der Quantifizierung in zwei Balkendiagrammen. Linkes Diagramm: Induktion von *mfa1*, *pra1* und *prf1* durch *fuz7DD* in den oben angegebenen Stämmen. Rechtes Diagramm: Die relative basale Expression von *mfa1*, *pra1* und *prf1* in den oben angegebenen Stämmen. Dafür wurde die jeweilig detektierte Transkriptmenge in *prf1-E1* auf 100 % gesetzt.

Diese Analysen zeigen, dass sowohl die putativen PKA-, als auch MAPK-Phosphorylierungsstellen in Prf1 für die *fuz7DD*-induzierte *b*-Genexpression essenziell sind. Die PKA-Phosphorylierungsstellen in Prf1 sind offensichtlich für die Grundaktivität des Proteins entscheidend, da bei ihrem Verlust die basale Expression der *a*-Gene stark reduziert war. Im Gegensatz dazu führte die Mutation der putativen MAPK-Phosphorylierungsstellen zu einer

Erhöhung des basalen Expressionsniveaus der *a*-Gene. Prf1-M1 ist offenbar im unstimulierten Zustand aktiver als das native Protein. Interessanterweise war die *fuz7DD*-stimulierte *prf1*-Expression sowohl in den *prf1-PI*-, als auch *prf1-M1*-Stämmen zu beobachten. Es ist daher möglich, dass diese Genregulation nicht durch Prf1, sondern durch einen anderen, noch nicht bekannten Faktor erfolgt.

Eine unerwartete Beobachtung war, dass es *fuz7DD* – trotz mutierter MAPK-Phosphorylierungsstellen in Prf1 – noch möglich war, die *a*-Gene, zwar schlechter als in Anwesenheit von unverändertem Prf1, aber immerhin dreifach zu induzieren. Entweder sind in Prf1-M1 nicht alle potentiellen MAPK-Phosphorylierungsstellen zerstört, oder diese beobachtete Regulation beruht nicht auf der hier postulierten Proteinmodifikation, sondern auf der erhöhten *prf1*-Expression, die nach *fuz7DD*-Expression in dem *prf1-M1*-Stamm beobachtet wurde (Abb. 16B). Um zwischen diesen möglichen Arten transkriptioneller und/oder posttranskriptioneller Regulation unterscheiden zu können, wurde *prf1* in FB1P<sub>crg1</sub>:*fuz7DD* durch das *prf1<sup>con</sup>*-Allel ersetzt, das mittels des *tefl*-Promotors eine konstitutive Expression von *prf1* ermöglicht.



**Abbildung 17: *fuz7DD* (A) und *kpp4-2* (B) -induzierte Genexpression in *prf1<sup>con</sup>* Stämmen.** Die verschiedenen FB1-Derivate wuchsen in Anwesenheit von Glukose (-) und 5 h in Arabinose-haltigem Medium (+). 10 µg Gesamt-RNA wurde pro Spur geladen und die Filter wurden mit den Sonden, die auf der rechten Seite angegeben sind, hybridisiert. Dabei diente die *rRNA* als Ladekontrolle.

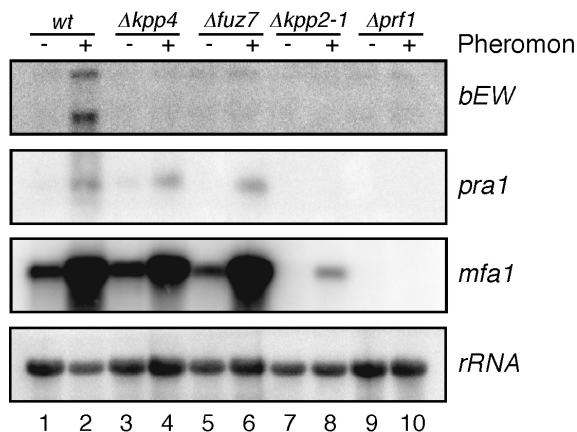
Die Northern-Analysen zeigten, dass in FB1*prf1<sup>con</sup>* und in FB1*prf1<sup>con</sup>P<sub>crg1</sub>:fuz7DD* die basale *mfa1*-Transkription stark erhöht war und durch *fuz7DD* nicht weiter stimuliert werden konnte (Abb. 17A). Vergleichbare Resultate wurden auch in FB1*prf1<sup>con</sup>P<sub>crg1</sub>:kpp4-2* und FB1*Δkpp2-1 prf1<sup>con</sup>P<sub>crg1</sub>:kpp4-2* festgestellt (Abb. 17B). Die basale *b*-Genexpression war hingegen weder in FB1*prf1<sup>con</sup>*, noch in FB1*prf1<sup>con</sup>P<sub>crg1</sub>:fuz7DD* nachweisbar erhöht und konnte durch *fuz7DD* deutlich induziert werden (Abb. 17A). Aus diesen Daten wird deutlich, dass *fuz7DD* die *b*-Genexpression reguliert, indem es wahrscheinlich die Aktivität von Prf1 erhöht. Der *fuz7DD*-induzierten *a*-Genexpression liegt interessanterweise eine Kombination aus transkriptioneller und posttranskriptioneller *prf1*-Regulation zugrunde.

## 2.1.4 Analyse der Pheromon-abhängigen Genexpression in $\Delta kpp4$ -, $\Delta fuz7$ - und $\Delta kpp2$ -1-Mutanten

Die bisherigen Ergebnisse konnten zeigen, dass Kpp4, Fuz7 und Kpp2 in einem Modul agieren, das wahrscheinlich an der Weiterleitung des Pheromonsignals beteiligt ist: Alle Komponenten werden für die volle Paarungskompetenz und für die Ausbildung von Konjugationshyphen benötigt. Eine genetische Aktivierung der Kaskade stimulierte nicht nur die Ausbildung von Konjugationshyphen-ähnlichen Filamenten, sondern induzierte auch die Expression *prf1*-regulierter Gene und für die transkriptionelle Regulation der *b*-Gene waren die putativen MAPK-Phosphorylierungsstellen in Prf1 wichtig. Zu diesem Bild passen ältere Resultate, die zeigten, dass der Verlust von *kpp2* eine stark reduzierte Pheromon-abhängige *mfa1*-Expression zur Folge hat (Müller *et al.*, 1999). Im Gegensatz dazu weisen aber *fuz7*-5-Mutanten, die ein durch ein Transposon unterbrochenes *fuz7*-Gen tragen, eine dem Wildtyp vergleichbare *mfa1*-Genexpression auf (Regenfelder *et al.*, 1997). Um diesen Widerspruch nachzugehen, wurde die Beteiligung von *kpp4*, *fuz7*, sowie *kpp2* an der transkriptionellen Pheromonantwort eingehender untersucht.

### 2.1.4.1 Der Verlust von *kpp4*, *fuz7* oder *kpp2* verhindert die Pheromon-induzierte Expression der *b*-Gene

Um den Einfluss von *kpp4*, *fuz7* und *kpp2* auf die Pheromon-induzierte Expression der *a*- und *b*-Gene zu untersuchen, wurden die Stämme FB1, FB1 $\Delta kpp4$ , FB1 $\Delta fuz7$ , FB1 $\Delta kpp2$ -1



**Abbildung 18: Pheromon-abhängige Genexpression in *kpp4*-, *fuz7*- und *kpp2*-Mutanten.** FB1 (*wt*) und die verschiedenen Derivate wurden 5 h in Anwesenheit von DMSO (-) oder 2,5 µg/ml synthetischem *a2*-Pheromon inkubiert. 10 µg Gesamt-RNA wurde pro Spur geladen und die Filter wurden mit den Sonden, die auf der rechten Seite angegeben sind, hybridisiert. Dabei diente die *rRNA* als Ladekontrolle.

und FB1 $\Delta prf1$  5 h mit synthetischem *a2*-Pheromon und auf gleiche Weise mit entsprechenden Mengen an DMSO behandelt. Die Northern-Analyse zeigte für den Wildtypstamm FB1 das erwartete Muster (Urban *et al.*, 1996b): In den unstimulierten Sporidien wurde das Pheromogen *mfa1* auf einem basalen Level transkribiert, die mRNAs des Pheromonrezeptor *pra1*, sowie der *b*-Gene, *bE* und *bW*, waren kaum nachweisbar (Abb. 18, Spur 1). Die Pheromonstimulation führte zu einer starken Induktion der *mfa1*-, *pra1*- sowie *bE*- und *bW*-Expression (Abb. 18, Spur 2). Als Negativkontrolle diente eine *prf1*-Deletionsmutante, in der wie erwartet keine Transkripte der *a*- und *b*-Gene nachgewiesen werden konnten (Abb. 18, Spuren 9 und 10; Hartmann *et al.*, 1996). In  $\Delta kpp4$ -Mutanten war keine

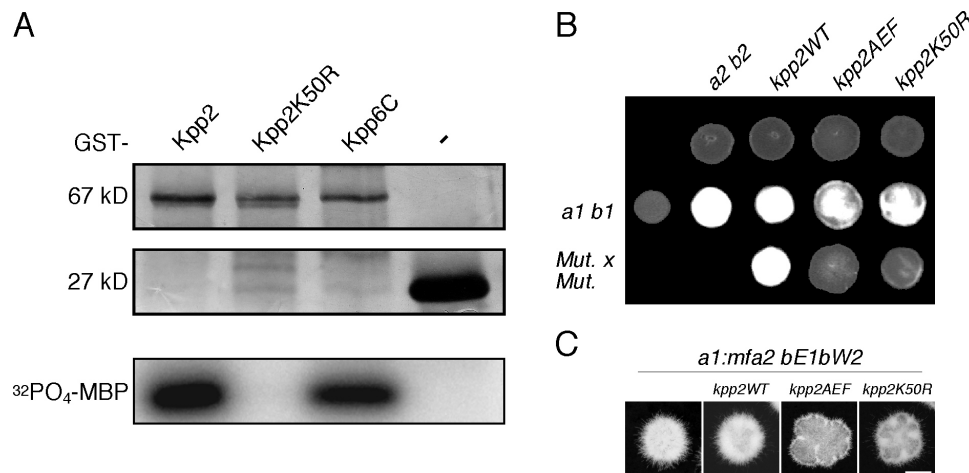
Pheromon-induzierte *b*-Genexpression mehr nachzuweisen – die Induktion der *a*-Gene, *mfa1* und *pra1*, war hingegen nicht betroffen (Abb. 18, Spuren 3 und 4). Eine vergleichbare Antwort wurde auch in *fuz7*-Deletionsmutanten beobachtet (Abb. 18, Spuren 5 und 6). In FB1Δ*kpp2*-1 konnten ebenfalls keine *bE*- und *bW*-mRNAs detektiert werden (Abb. 18, Spur 8). In FB1Δ*kpp2*-1 war im Gegensatz zu den anderen Mutanten jedoch sowohl die basale, als auch die Pheromon-induzierte Transkription der *a*-Gene stark reduziert (Abb. 18, Spuren 7 und 8). *Kpp4*, *Fuz7* und *Kpp2* sind also für die Pheromon-induzierte *b*-Genexpression essenziell, aber nur *kpp2* ist an der *a*-Genexpression beteiligt.

#### 2.1.4.2 Der Einfluss von *Kpp2* auf die *a*-Genexpression ist unabhängig von der Kinaseaktivität

Im Gegensatz zu *kpp4* und *fuz7*, ist *kpp2* an der Pheromon-abhängigen *a*-Genexpression beteiligt (siehe 2.1.4.1). Diese Funktion von *Kpp2* ist also möglicherweise unabhängig von der Aktivierung durch *Fuz7*. Daher war es vorstellbar, dass *Kpp2* diese Funktion unabhängig von seiner enzymatischen Aktivität ausüben könnte. Um diese Hypothese zu prüfen, wurden zwei verschiedene *kpp2*-Allele hergestellt, *kpp2AEF* und *kpp2K50R*. *Kpp2AEF* enthält zwei Aminosäuresubstitutionen in der konservierten Phosphataktzeptorstelle, dem sogenannten T-Loop TXY (T182A und Y184F), an denen MAP-Kinasen von den aktivierenden MAPK-Kinasen phosphoryliert und dadurch aktiviert werden (Payne *et al.*, 1991; Robbins *et al.*, 1993). Der Aminosäureaustausch in *Kpp2K50R* sollte zu einem Defekt in der ATP-Bindung führen, das mutierte Protein sollte also keine enzymatische Aktivität mehr besitzen (Madhani *et al.*, 1997).

Um sicherzustellen, dass *kpp2K50R* für eine nicht-aktive Kinase kodiert, wurde die Kinaseaktivität von *Kpp2* und *Kpp2K50R* *in vitro* untersucht. Dafür wurden Glutathion S-Transferase-Fusionsproteine, GST-*Kpp2* und GST-*Kpp2K50R*, in *E. coli* exprimiert. Zusätzlich wurde auch GST alleine und das Fusionsprotein GST-*Kpp6C*, das die C-terminale Kinasedomäne der *Kpp2*-ähnlichen MAPK *Kpp6* umfasst, hergestellt. Die aufgereinigten Proteine wurden mit radioaktivem [ $\gamma$ -<sup>32</sup>P]-ATP und dem "myelin basic protein" (MBP), das als Substrat diente, gemischt und 20 min bei 28°C inkubiert. Die Proteine wurden dann mittels SDS-PAGE aufgetrennt und phosphoryliertes MBP durch Radiographie nachgewiesen. Wie in Abbildung 19A dargestellt, konnten GST-*Kpp2* und GST-*Kpp6C* MBP effizient phosphorylieren, in den Ansätzen mit GST-*Kpp2K50R* und GST war hingegen keine Phosphorylierung nachzuweisen. Dies macht deutlich, dass *Kpp2* und *Kpp6C* funktionale Kinasen darstellen. Da *Kpp2K50R* keine nachweisbare Kinaseaktivität mehr besitzt, sollte es mit Hilfe dieses Allels möglich sein, potentielle Funktionen von *Kpp2* zu untersuchen, die nicht mit der enzymatischen Aktivität zusammenhängen. Es wurden daher *U. maydis*-Stämme hergestellt, die entweder *kpp2AEF* oder *kpp2K50R* tragen. Dafür wurde in FB1 und FB2 das endogene *kpp2*-Allel durch jeweils *kpp2AEF* oder *kpp2K50R* ersetzt. Als Kontrolle dienten FB1*kpp2*WT und FB2*kpp2*WT, die auf gleiche Weise hergestellt wurden und das im ORF

unveränderte *kpp2*WT im *kpp2*-Locus tragen. Im Plattenkreuzungstest zeigten diese Kontrollstämme FB1*kpp2*WT und FB2*kpp2*WT keinen Unterschied zum Wildtyp (Abb. 19B). Dagegen war der Fuz<sup>+</sup>-Phänotyp der Mischungen von *kpp2*AEF-, sowie *kpp2*K50R-Stämmen mit einem kompatiblen Wildtyppartner etwas abgeschwächt, und in kompatiblen Mutanten-Kombinationen war diese Filamentbildung deutlich reduziert (Abb. 19B).



**Abbildung 19: Analyse der verschiedenen Kpp2-Varianten.** A) Der Aminosäureaustausch K50R führt zum Verlust der Kinaseaktivität von Kpp2. Die GST-Fusionsproteine wurden in *E. coli* exprimiert und aufgereinigt und in Kinasereaktionen eingesetzt. Die oberen beiden Reihen sind Ausschnitte aus dem Coomassie-Blau gefärbten SDS-PAGE. Die untere Reihe zeigt anhand eines Autoradiogramms das in MBP eingebaute, radioaktive Phosphat. B) Die oben angegebenen Stämme sind FB2 (*a2 b2*) und Derivate. Sie wurden entweder alleine (obere Reihe), mit FB1 (*a1 b1*; mittlere Reihe) oder mit der jeweiligen Mutante (untere Reihe) auf PD-Aktivkohle-Festmedium aufgetropft und 48 h bei 28°C inkubiert. C) SG200 und die angegebenen Derivate wurden auf PD-Aktivkohle-Festmedium zu Einzelkolonien ausgestrichen und 48 h bei 28°C inkubiert. Der Größenstandard entspricht 500 µm.

Die auf gleiche Weise hergestellten Stämme SG200*kpp2*K50R und SG200*kpp2*AEF zeigten auf Aktivkohleplatten eine reduzierte Filamentbildung, der Kontrollstamm SG200*kpp2*WT hingegen war von SG200 nicht zu unterscheiden (Abb. 19C).

Stimulierte man FB1*kpp2*WT, FB1*kpp2*AEF und FB1*kpp2*K50R mit synthetischem Pheromon, so konnte nur bei FB1*kpp2*WT Bildung von Konjugationshyphen beobachtet werden (Tabelle 3). Diese Ergebnisse zeigen, dass sowohl eine Aktivierung von Kpp2 als auch die enzymatische Aktivität für die Paarungskompetenz, die Konjugationshyphenbildung und die Pheromon-abhängige Filamentbildung in SG200 benötigt werden.

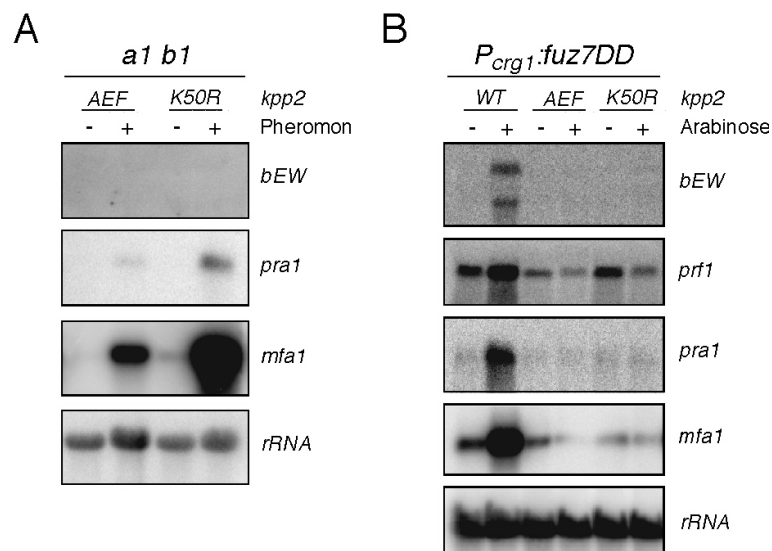
**Tabelle 3: Konjugationshyphenbildung<sup>a</sup>**

Stamm	Anzahl Zellen	Konjugationshyphenbildung in %
FB1 <i>kpp2</i> WT	480	75
FB1 <i>kpp2</i> AEF	532	0
FB1 <i>kpp2</i> K50R	541	0

<sup>a</sup>Die Zellen wurden 5 h mit synthetischem *a2*-Pheromon behandelt und die Konjugationshyphenbildung wurde mittels Mikroskopie bestimmt.

Die Analyse der Pheromon-abhängigen Genexpression in FB1kpp2AEF und FB1kpp2K50R zeigte, dass in keiner der Mutanten *b*-Genexpression nachzuweisen war (Abb. 20A). In Bezug auf die Transkription der *a*-Gene, *mfa1* und *pra1*, verhielten sich die Mutanten aber unterschiedlich: In FB1kpp2AEF war die basale und Pheromon-induzierte *mfa1*- und *pra1*-Transkription stark reduziert, wohingegen FB1kpp2K50R auf den Pheromonstimulus reagierte (Abb. 20A). Damit zeigte FB1kpp2AEF eine transkriptionelle Pheromonantwort, die mit FB1Δkpp2-1 vergleichbar war, FB1kpp2K50R verhielt sich hingegen ähnlich wie *kpp4*- und *fuz7*-Deletionsstämme (vergleiche mit Abb. 18).

Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass Kpp2 während der transkriptionellen Pheromonantwort mindestens zwei Funktionen innehat: Die eine betrifft die Regulation der *b*-Gene und ist abhängig von der Aktivierung durch Fuz7 sowie der Kinaseaktivität. Die andere Funktion ist für die *a*-Genexpression wichtig und ist unabhängig von der enzymatischen Aktivität, benötigt aber einen intakten T-Loop.

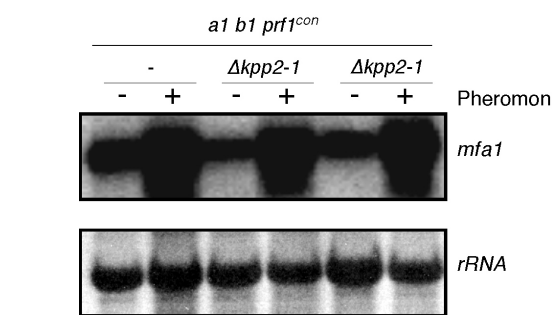


**Abbildung 20: Northern-Analyse der *kpp2AEF*- und *kpp2K50R*-Stämme.** **A)** Die FB1- (*a1 b1*) -Derivate, FB1kpp2AEF und FB1kpp2K50R, wurden 5 h in Anwesenheit von DMSO (-) oder 2,5 µg/ml synthetischem *a2*-Pheromon inkubiert. **B)** Die FB1P<sub>crg1</sub>:fuz7DD-Derivate, FB1kpp2WTP<sub>crg1</sub>:fuz7DD, FB1kpp2AEFP<sub>crg1</sub>:fuz7DD und FB1kpp2K50R-P<sub>crg1</sub>:fuz7DD, wurden in Anwesenheit von Glukose (-) und 5 h in Arabinose-haltigem Medium (+) angezogen. **A)** und **B)** 10 µg Gesamt-RNA wurde pro Spur geladen und die Filter wurden mit den Sonden, die auf der rechten Seite angegeben sind, hybridisiert. Dabei diente die *rRNA* als Ladekontrolle.

Aufgrund dieser Kinase-unabhängigen Funktion von Kpp2 war es nun wichtig zu prüfen, ob die Kinaseaktivität von Kpp2 für die *fuz7DD*-induzierte Genexpression benötigt wird. Dafür wurde das endogene *kpp2*-Allel in FB1P<sub>crg1</sub>:fuz7DD durch *kpp2WT*, *kpp2K50R* oder *kpp2AEF* ersetzt. Nach Expression von *fuz7DD* zeigte FB1kpp2WTP<sub>crg1</sub>:fuz7DD den typischen morphologischen Wechsel (nicht gezeigt) und eine starke Erhöhung der *a*- und *b*-Gentranskrip-

tion, wohingegen weder in FB1kpp2AEFP<sub>crgl</sub>:fuz7DD, noch in FB1kpp2K50RP<sub>crgl</sub>:fuz7DD Veränderungen zu detektieren waren (Abb. 20B). Auch die in FB1kpp2WTP<sub>crgl</sub>:fuz7DD induzierte *prf1*-Expression war in *kpp2AEF*- und *kpp2K50R*-Stämmen nicht mehr zu beobachten (Abb. 20B). Stattdessen erniedrigte der Wechsel der Kohlenstoffquelle von Glukose zu Arabinose die Menge an *prf1*-Transkripten, wie es schon für den Wildtyp FB1 beobachtet wurde (Abb. 20B, siehe auch Abb. 14B). Diese Resultate weisen darauf hin, dass Fuz7DD die Morphologie verändert und die Transkription von *prf1*, sowie der *a*- und *b*-Gene induziert, indem es die Kinaseaktivität von Kpp2 durch Phosphorylierung erhöht.

Interessanterweise war die basale *prf1*-Expression der *kpp2AEF*- und *kpp2K50R*-Stämme in Glukose-haltigem Medium unterschiedlich. Eine Quantifizierung ergab, dass im Vergleich zum *kpp2WT*-Stamm in FB1kpp2AEFP<sub>crgl</sub>:fuz7DD die Menge an *prf1*-Transkripten um ca. 60 % erniedrigt war, wohingegen in FB1kpp2K50RP<sub>crgl</sub>:fuz7DD keine Veränderung zu de-



**Abbildung 21: Analyse der *mfa1*-Expression in *prf1<sup>con</sup>*-Stämmen:** FB1*prf1<sup>con</sup>* und die *Δkpp2-1*-Derivate wurden 5 h in Anwesenheit von DMSO (-) oder 2,5 µg/ml synthetischem *a2*-Pheromon inkubiert. 10 µg Gesamt-RNA wurde pro Spur geladen, und die Filter wurden mit *mfa1* und *rRNA* als Ladekontrolle hybridisiert.

tektieren war (Abb. 20B). Das zeigt, dass Kpp2, aber nicht seine Kinaseaktivität für die Transkription von *prf1* wichtig ist. Das gleiche Phänomen wurde auch für die Funktion von Kpp2 während der Pheromon-regulierten *a*-Genexpression beobachtet. Da *prf1* für die Expression der *a*-Gene den entscheidenden Faktor darstellt, war vorstellbar, dass die reduzierte *a*-Genexpression in *Δkpp2-1*- und in *kpp2AEF*-Mutanten direkt eine Folge der niedrigen *prf1*-Expression ist. Um diese Annahme zu prüfen, wurde in *Δkpp2-1*-Mutanten der endogene *prf1*-Promotor gegen den *tef1*-Promotor ausgetauscht, der eine konstitutive Transkription vermittelt.

Die resultierenden Stämme FB1*prf1<sup>con</sup>Δkpp2-1* und FB2*prf1<sup>con</sup>Δkpp2-1* zeigten eine hohe *prf1*-Expression und waren im Kreuzungstest von den *Δkpp2-1*-Ausgangsmutanten nicht zu unterscheiden (nicht gezeigt). Untersuchte man nun in FB1*prf1<sup>con</sup>Δkpp2-1* die *mfa1*-Expression, so zeigte sich, dass sowohl die basale, als auch die Pheromon-induzierte Transkription mit der des Kontrollstamms FB1*prf1<sup>con</sup>* vergleichbar war (Abb. 21). Die konstitutive *prf1*-Expression kann also den Defekt in der *a*-Genregulation in *Δkpp2-1*-Mutanten kompensieren. Demzufolge könnte die zu niedrige *prf1*-Transkription in *Δkpp2-1*-Mutanten eine Ursache für die reduzierte *a*-Genexpression sein.

Zusammenfassend kann man schlussfolgern, dass das Kpp4/Fuz7/Kpp2-Modul für die Pheromon-regulierte Expression der *b*-Gene, nicht aber für die der *a*-Gene benötigt wird. Daher muss noch mindestens ein weiterer Signalweg an der Weiterleitung des Pheromonsignals beteiligt sein.



## 2.2 Biochemische Analyse des Kpp4/Fuz7/Kpp2-Moduls

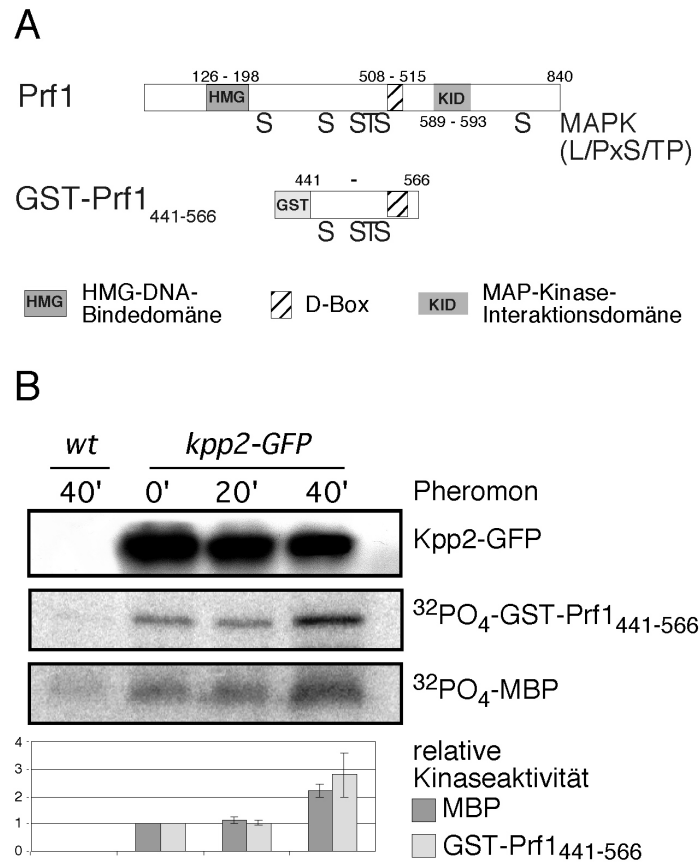
Die bisher präsentierten Ergebnisse lassen den Schluss zu, dass Kpp4, Fuz7 und Kpp2 in einem Modul agieren, das an der Weiterleitung des Pheromonsignals beteiligt ist. Die Inaktivierung der Kaskade durch Deletion einer ihrer Komponenten führte zum Verlust der Konjugationshyphenbildung und der Pheromon-regulierten *b*-Genexpression. Eine Aktivierung der Kaskade durch konstitutive Allele von *kpp4* und *fuz7* dagegen induzierte Konjugationshyphen-ähnliche Strukturen sowie die Expression *prf1*-regulierter Gene. Bei dieser transkriptionellen Regulation spielten putative MAPK-Phosphorylierungstellen in Prf1 eine wichtige Rolle. Es wurden nun verschiedene biochemische und zellbiologische Ansätze gewählt, um die bisher mit genetischen Methoden erlangten Befunde zu stützen.

### 2.2.1 Kpp2 wird durch Pheromonstimulus aktiviert und kann Prf1 *in vitro* phosphorylieren

Wenn das Kpp4/Fuz7/Kpp2-Modul das Pheromonsignal weiterleitet, sollte ein Pheromonstimulus die Kinaseaktivität von Kpp2 erhöhen. Um dem nachzugehen, wurde ein Immuno-Kinasetest durchgeführt, der es erlaubt nach Immunopräzipitation die Aktivität einer Kinase direkt zu untersuchen. Da für Kpp2 kein Antikörper vorhanden war, wurden im ersten Schritt Stämme hergestellt, die ein mit GFP markiertes Kpp2 exprimierten. Hierfür wurde das endogene *kpp2*-Allel durch *kpp2-GFP* ersetzt. Die so hergestellten Stämme FB1kpp2-GFP und FB2kpp2-GFP wiesen weder in der Paarungskompetenz, noch bei der Ausbildung von Konjugationshyphen einen signifikanten Defekt auf (nicht gezeigt). Daher ist davon auszugehen, dass der GFP-Anteil im Kpp2-GFP Fusionsprotein mit der Funktion von Kpp2 *in vivo* nicht interferiert. Um die Kinaseaktivität von Kpp2-GFP zu bestimmen, wurden nun vor und nach Pheromonbehandlung aus FB2kpp2-GFP Proteinextrakte hergestellt, das Fusionsprotein mit  $\alpha$ -GFP-Antikörpern immunopräzipitiert und in eine Kinasereaktion eingesetzt. In drei unabhängigen Experimenten konnte 40 min nach Pheromonbehandlung eine zweifache Induktion der Kinaseaktivität von Kpp2-GFP beobachtet werden (Abb. 22B). Kpp2 wird also durch Pheromon aktiviert.

Diese Aktivitätstests wurden nun herangezogen, um zu prüfen, ob Kpp2 Prf1 phosphorylieren kann. Da das vollständige Prf1-Protein in *E.coli* nicht in löslicher Form zu exprimieren ist (Hartmann, 1997), wurde ein verkürztes GST-Prf1<sub>441-566</sub>-Fusionsprotein in *E. coli* exprimiert, aufgereinigt und in die Kinasereaktion eingesetzt. Prf1<sub>441-566</sub> enthält den zentralen Teil von Prf1 (Aminosäuren 441 - 566) und umfasst damit vier potentielle MAPK-Phosphorylierungstellen, sowie eine putative D-Box, von denen bekannt ist, dass sie Interaktionen mit MAPK vermitteln (Abb. 22A). GST dagegen enthält keine putativen MAPK-Phosphorylierungstellen. Es zeigte sich, dass Kpp2 in der Lage ist, das GST-Prf1<sub>441-566</sub>-Fusionsprotein zu phosphorylieren (Abb. 22B). Auch in diesen Experimenten war die Aktivität von Kpp2 durch Pheromongabe erhöht (Abb. 22B).

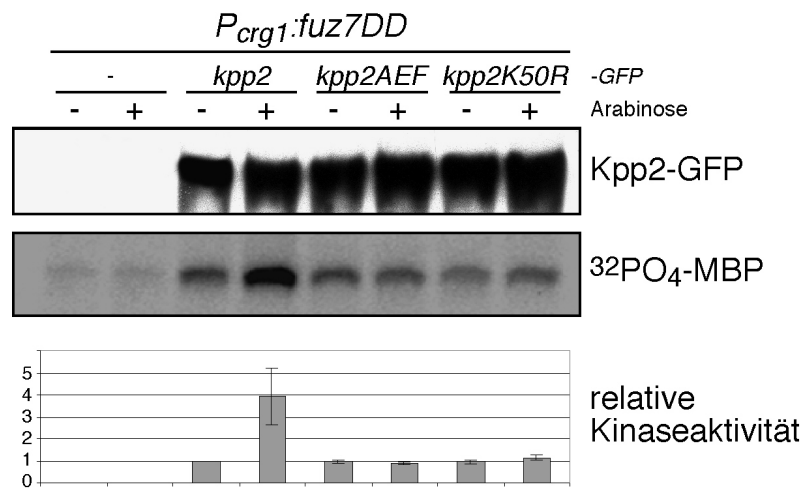
Diese Experimente zeigen damit, dass die Kinaseaktivität von Kpp2 nach Pheromonstimulation zunimmt und Kpp2 in der Lage ist, Prf1 zu phosphorylieren.



**Abbildung 22: Kpp2 wird nach Pheromonstimulation aktiviert.** **A)** Schematische Darstellung des GST-Prf1<sub>441-566</sub>-Fusionsproteins, das in die Kinasereaktion eingesetzt wurde. Es umfasst die vier zentralen MAPK-Phosphorylierungsstellen und die D-Box. Die Aminosäurepositionen sind in Zahlen angegeben. **B)** Aus Proteinextrakten der oben angegebenen Stämme wurde vor und nach 20 und 40 min Kpp2-GFP immunopräzipitiert. Die obere Reihe zeigt den Nachweis des präzipitierten Fusionsproteins mit Hilfe eines  $\alpha$ -GFP-Antikörpers. Die zwei mittleren Reihen illustrieren das in MBP bzw. GST-Prf1<sub>441-566</sub> eingebaute radioaktive Phosphat. Das Balkendiagramm in der unteren Reihe fasst die relative Kinaseaktivität von Kpp2-GFP in drei unabhängigen Versuchen zusammen. Dabei wurde das inkorporierte Phosphat quantifiziert und in Verhältnis zu dem Einbau zum Zeitpunkt 0 min gesetzt.

## 2.2.2 Die Expression von *fuz7DD* erhöht die Kinaseaktivität von Kpp2

Nach den durchgeführten genetischen Experimenten ist Fuz7 in der Signalkette oberhalb von Kpp2 einzuordnen. Daher wurde untersucht, ob die Expression von *fuz7DD* die Aktivität von Kpp2 stimulieren kann. Dafür wurde in FB1P<sub>cr1</sub>:*fuz7DD* das endogene *kpp2*-Allel entweder durch *kpp2-GFP*, *kpp2AEF-GFP* oder *kpp2K50R-GFP* ersetzt und aus den resultierenden Stämmen vor und nach 90 min Wachstum in Medium mit Arabinose Proteinextrakt hergestellt. Die immunopräzipitierten Fusionsproteine wurden dann in Kinasereaktionen eingesetzt.



**Abbildung 23: Kpp2 wird durch Expression von *fuz7DD* aktiviert.** Aus Proteinextrakten von FB1P<sub>crg1</sub>:*fuz7DD* und oben angegebenen Derivaten wurde vor (-) und nach 90 min (+) Wachstum in Arabinose-haltigem Medium Kpp2-GFP und Derivate immunopräzipitiert. Die obere Reihe zeigt den Nachweis der präzipitierten Fusionsproteine mit Hilfe eines  $\alpha$ -GFP-Antikörpers. Die mittlere Reihe illustriert das in MBP eingebaute radioaktive Phosphat. Das Balkendiagramm fasst die relative Kinaseaktivität von Kpp2 und der Derivate in drei unabhängigen Versuchen zusammen. Dabei wurde das inkorporierte Phosphat quantifiziert und in Verhältnis zu dem quantifizierten Einbau zum Zeitpunkt 0 min gesetzt.

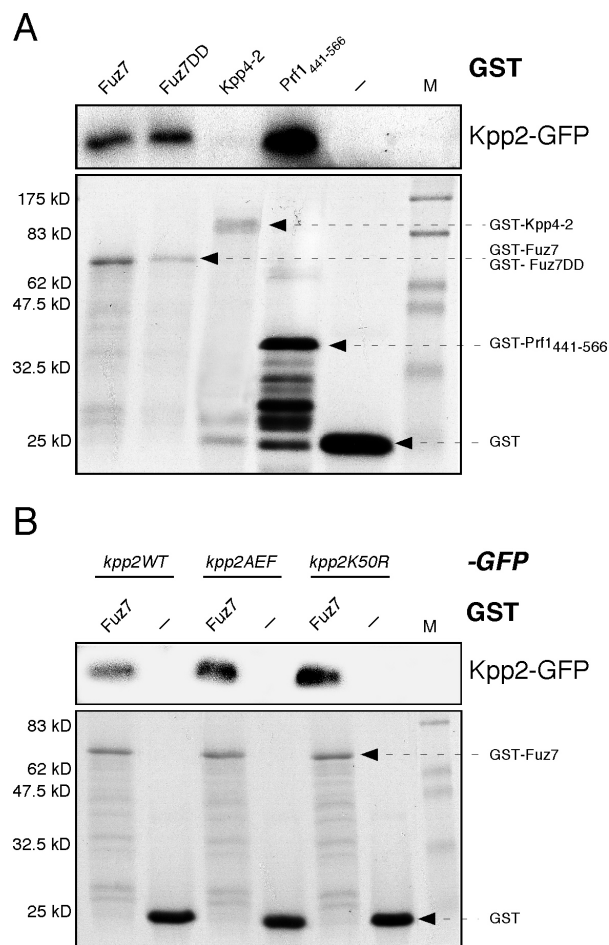
Nach Expression von *fuz7DD* war die Aktivität von Kpp2-GFP vierfach gesteigert (Abb. 23). Wie erwartet konnte Fuz7DD weder die Aktivität von Kpp2AEF-GFP noch von Kpp2K50R-GFP erhöhen (Abb. 23). Jedoch beobachtete man in allen Ansätzen einen höheren Anteil an phosphoryliertem MBP als in Kontrollexperimenten, in denen Proteinextrakte aus FB1P<sub>crg1</sub>:*fuz7DD* eingesetzt wurden (Abb. 23). Dies könnte auf eine andere Kinase zurückgeführt werden, die mit Kpp2-GFP koimmunopräzipitiert, deren Aktivität aber nicht von Fuz7DD beeinflusst wird.

Die Expression von *fuz7DD* erhöht also die Aktivität von Kpp2. Es ist wahrscheinlich, dass Kpp2 direkt durch eine duale Phosphorylierung von Fuz7 modifiziert wird. Leider konnte diese Phosphorylierung nicht *in vitro* nachvollzogen werden, da es nicht möglich war, aktives GST-Fuz7 oder GST-Fuz7DD aus *E. coli* aufzureinigen.

### 2.2.3 Kpp2 interagiert mit Fuz7 und Prf1

Die vorangegangenen Daten haben gezeigt, dass die Expression von *fuzDD* Kpp2 aktivieren kann und Kpp2 in der Lage ist, Prf1 zu phosphorylieren. Daher lag die Vermutung nahe, dass Fuz7 und Kpp2, sowie Kpp2 und Prf1 interagieren. Interaktion von MAP-Kinasen mit regulierenden Proteinen, wie Phosphatasen, aber auch mit Transkriptionsfaktoren werden durch so genannte „docking sites“ (*D-boxes*) vermittelt (Enslin und Davis, 2001). Diese D-Boxen sind durch die Konsensussequenz (R/K)<sub>2</sub>-(x)<sub>2-6</sub>-L/I-x-L/I definiert, und eine solche putative D-Box ist sowohl in Fuz7, als auch in Prf1 zu finden (siehe Abb. 10A und 22A; Bardwell *et al.*,

2001). Daher wurden in „GST-pulldown-Assays“ die möglichen Interaktionen von Kpp2 mit Fuz7 und Prf1 untersucht. Dafür wurden die bakteriell exprimierten Proteine GST-Fuz7, GST-Fuz7DD und GST-Prf1<sub>441-566</sub> an GSH-Sepharose immobilisiert. Als Kontrollen dienten das GST-Kpp4-2-Fusionsprotein, das die gesamte katalytische Domäne von Kpp4 umfasst, sowie GST alleine. Nun wurde getestet, ob es mit Hilfe dieser immobilisierten Proteine möglich war, aus Proteinextrakten des Stammes FB2kpp2-GFP, das Kpp2-GFP Fusionsprotein anzureichern. Die Western-Analyse zeigte, dass Kpp2-GFP mit GST-Fuz7, GST-Fuz7DD und GST-Prf1<sub>441-566</sub> aufgereinigt werden konnte (Abb. 24A). Mit GST-Kpp4-2 und GST hingegen konnte keine Anreicherung festgestellt werden (Abb. 24A). Diese Befunde demonstrieren, dass Kpp2 mit Fuz7 und dem zentralen Teil von Prf1 *in vitro* interagieren kann.



**Abbildung 24: Kpp2-GFP interagiert mit Fuz7 und Prf1.** **A)** Ein Proteinextrakt aus FB2kpp2-GFP wurde je mit den oben angegebenen GST-Fusionsproteinen, die an GSH-Sepharose gebunden waren, inkubiert. Die obere Reihe zeigt das so angereicherte Kpp2-GFP-Protein, nachgewiesen mit einem  $\alpha$ -GFP-Antikörper. Die untere Reihe zeigt die an der GSH-Sepharose gebundenen GST-Fusionsproteine, dargestellt mit einer Coomassie-Blau-Färbung. **B)** Proteinextrakte aus FB2kpp2-GFP (*kpp2WT*), FB2kpp2AEF-GFP (*kpp2AEF*), sowie FB2kpp2K50R-GFP (*kpp2K50R*) wurden mit GST-Fuz7 oder GST, die beide an GSH-Sepharose gebunden waren, inkubiert. Darstellung wie unter A) beschrieben.

In einem weiteren Experiment wurde untersucht ob auch die Kpp2 Varianten Kpp2AEF und Kpp2K50R, die durch Fuz7 nicht aktiviert wurden, mit Fuz7 interagieren können. Es zeigte sich, dass Kpp2-GFP, sowie Kpp2AEF-GFP und Kpp2K50R-GFP, mit GST-Fuz7 aufgereinigt werden konnten (Abb. 24B). Das lässt darauf schließen, dass die in Kpp2AEF sowie Kpp2K50R eingeführten Aminosäureaustausche die Interaktion mit Fuz7 nicht stören.

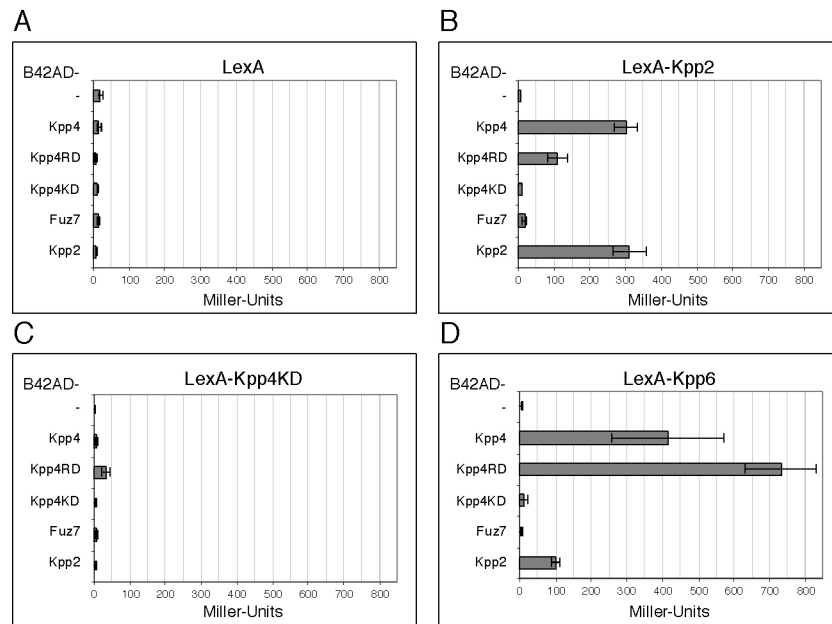
## 2.2.4 Interaktionen zwischen den bekannten MAPK-Modul-Komponenten

Die Interaktionen zwischen den Komponenten des Kpp4/Fuz7/Kpp2-Moduls wurden parallel auch mit Hilfe des „Two-Hybrid“-Systems in *S. cerevisiae* untersucht. In dem gewählten LexA-System der Firma Clontech führt eine Interaktion der im Hefestamm EGY48[p8op-lacZ] koexprimierten Fusionsproteine – das eine Fusionsprotein enthält das B42-Peptid (B42AD), das transaktivierende Aktivität besitzt, und das andere die DNA-Bindedomäne des bakteriellen Transkriptionsfaktors LexA – zu der Stimulation des Reportergens *lacZ*. Daher kann in diesem System die  $\beta$ -Galaktosidase-Aktivität, die in Miller-Units gemessen wird (Miller, 1972), als Maßeinheit für eine Interaktion angesehen werden.

In der ersten Analyse wurden folgende B42AD-Fusionsproteine auf Interaktion mit LexA-Kpp2 getestet: das gesamte Kpp4-Protein, die regulatorische Domäne Kpp4RD (Aminosäure 1 - 964), die katalytische Domäne Kpp4KD (Aminosäure 1053 - 1566), Fuz7 und Kpp2.

Wie aus Abbildung 25A ersichtlich ist, konnte keines dieser Fusionsproteine allein die Expression des *lacZ*-Reportergens stimulieren. Bei Koexpression von LexA-Kpp2 und B42AD-Kpp4 wurde aber eine  $\beta$ -Galaktosidase-Aktivität von über 300 Miller-Units beobachtet (Abb. 25B). Interessanterweise, führte die Kombination aus LexA-Kpp2 und B42AD-Kpp4RD ebenfalls zu einer Induktion von ca. 110 Miller-Units, LexA-Kpp2 und B42AD-Kpp4KD konnten die  $\beta$ -Galaktosidase-Aktivität dagegen nicht erhöhen (Abb. 25B). Aus diesen Daten wird ersichtlich, dass Kpp2 und Kpp4 interagieren, und diese Interaktion über Bereiche in Kpp4 vermittelt wird, die sich in der regulatorischen Domäne befinden.

Die Koexpression von LexA-Kpp2 und B42AD-Kpp2 stimulierte ebenfalls die  $\beta$ -Galaktosidase Aktivität (über 300 Miller-Units; Abb. 25B). Ein Kpp2-Protein kann also mit einem anderen Kpp2-Protein interagieren. Überraschenderweise führte die Kombination von LexA-Kpp2 und B42AD-Fuz7 aber zu keiner Expression des Reportergens (Abb. 25B). Dies war erstaunlich, da in dem biochemischen Ansatz eine Interaktion zwischen Kpp2 und Fuz7 wiederholt festgestellt werden konnte (siehe 2.2.3). Um auszuschließen, dass das verwendete pB42AD-Fuz7-Konstrukt fehlerhaft ist, wurden zwei weitere, neu konstruierte Plasmide, pB42AD-Fuz7-II und pLexA-Fuz7, hergestellt und mit pLexA-Kpp2 bzw. pB42AD-Kpp2 getestet. Auch in diesen Tests kam es zu keiner Stimulation der Reportergene (nicht gezeigt). Es ist somit wahrscheinlich, dass es in *S. cerevisiae* zu einem Problem bei der Expression der B42AD-Fuz7- und LexA-Fuz7-Fusionsproteine gekommen ist. Diese Annahme wurde aber im Rahmen dieser Arbeit nicht in einer Western-Analyse geprüft.



**Abbildung 25:  $\beta$ -Galaktosidase-Aktivität im „Two-Hybrid“-Test.** Messergebnisse (Mittelwerte) und deren Standardabweichungen aus der Aktivitätsmessung von fünf unabhängigen Transformanten, die je zweimal gemessen wurden, sind in Miller-Units angegeben (für die genauen Werte siehe Abschnitt 4.1.2.5). **A)** Die B42AD-Fusionsproteine zeigen keine Eigenaktivität. **B)** LexA-Kpp2-Fusionsprotein interagiert mit B42AD-Kpp4, B42AD-Kpp4RD und B42AD-Kpp2. **C)** Die Kinasedomäne von Kpp4 (LexA-Kpp4KD) interagiert mit der regulatorischen Domäne (B42AD-Kpp4RD). **D)** Kpp6 zeigt eine Interaktion mit B42AD-Kpp4, B42AD-Kpp4RD und B42AD-Kpp2.

In weitergehenden Analysen wurde untersucht, ob die Kombination aus LexA-Kpp4KD mit entweder B42AD-Kpp4, B42AD-Kpp4KD, B42AD-Kpp4RD, B42AD-Fuz7 oder B42AD-Kpp2 zu einer Induktion der  $\beta$ -Galaktosidase Aktivität führt. Es zeigte sich, dass nur die Koexpression von LexA-Kpp4KD und B42AD-Kpp4RD eine leichte Induktion des Reportergens auf  $32 \pm 10$  Miller-Units verursachte, wohingegen die erwartete Interaktion zwischen Kpp4KD und Fuz7 ausblieb (Abb. 25C). Es ist anzunehmen, dass auch in diesem Fall es zu Problemen bei der Expression des B42AD-Fuz7-Fusionsproteins gekommen ist.

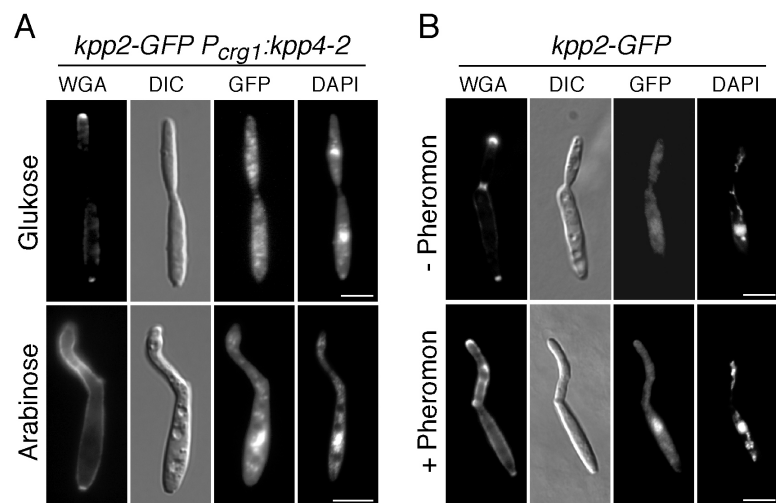
Zusätzlich wurde getestet, ob die Kpp2-ähnliche MAPK Kpp6, die während der Pheromonantwort keine offensichtliche Funktion ausübt und aufgrund der Episitasis-Analyse wahrscheinlich nicht in dem Kpp4/Fuz7/Kpp2-Modul liegt, mit einer der hier getesteten Komponenten interagieren kann. In dieser Analyse zeigte sich, dass Kpp6 mit Kpp4 interagiert und sich die Bereiche, die diese Interaktion vermitteln, in der regulatorischen Domäne von Kpp4 befinden (Abb. 25D). Bemerkenswerterweise führte auch die Koexpression von LexA-Kpp6 und B42AD-Kpp2 zu einer deutlichen Stimulation der  $\beta$ -Galaktosidase-Aktivität von über 85 Miller-Units (Abb. 25D). Kpp6 und Kpp2 können scheinbar Heterodimere ausbilden. Ob Kpp6 mit Fuz7 interagieren kann, konnte leider auf Grund der schon beschriebenen Probleme mit der Expression der B42AD-Fuz7-Fusionsproteinen nicht entschieden werden.

## 2.2.5 Pheromon sowie *kpp4-2* beeinflussen die subzelluläre Lokalisation von Kpp2

Von verschiedenen MAP-Kinasen war bekannt, dass ihre Aktivierung mit einem Transport des Proteins vom Zytoplasma in den Zellkern einhergeht (Reiser *et al.*, 1999; van Drogen und Peter, 2001). Daher wurde im Folgenden untersucht, ob eine Aktivierung von Kpp2 die subzelluläre Lokalisation des Proteins beeinflusst. Für diese Analyse wurde *P<sub>crg1</sub>::kpp4-2* in FB2kpp2-GFP eingebracht und der resultierende Stamm in Medium mit Glukose angezogen und danach in Medium mit Arabinose überführt. Es wurden vor und 3 h nach Medienwechsel Zellaliquots entnommen und diese mit zwei verschiedenen Farbstoffen behandelt. Dabei diente DAPI zum Visualisieren des Zellkerns und WGA zum Anfärben der wachsenden Zellwand. In Abbildung 26A sind die Ergebnisse exemplarisch dargestellt. Vor Expression von *kpp4-2* teilten sich die Zellen durch Knospung, WGA färbte die Spitze der wachsenden Knospe, und Mutter- sowie Tochterzelle trugen je einen Zellkern (diese Zellen stehen also kurz

vor der Zytokinese, Abb. 26A, obere Reihe). In diesem Stadium konnte GFP-Fluoreszenz im Zytoplasma und im Zellkern nachgewiesen werden (Abb. 26A, obere Reihe). Nach Expression von *kpp4-2* bildeten die Zellen die charakteristischen Filamente aus, die über die gesamte Länge mit WGA angefärbt werden konnten (Abb. 26A, untere Reihe). Diese Zellen trugen nur einen Zellkern und GFP-Fluoreszenz war hauptsächlich in diesem Kompartiment der Zelle zu finden (Abb. 26A, untere Reihe). Kpp2-GFP ist also nach Expression von *kpp4-2* zum größten Teil im Zellkern lokalisiert.

Vergleichbare Beobachtungen wurden auch nach einer Pheromonstimulation gemacht. Vor Stimulation konnte nur ein geringer Anteil des Kpp2-GFP-Fusionsproteins im Zellkern detektiert werden, wohingegen nach Pheromongabe die GFP-Fluoreszenz hauptsächlich im



**Abbildung 26: Analyse der subzellulären Lokalisation des Kpp2-GFP-Fusionsproteins vor und nach Stimulation.** A) Von FB2kpp2-GFP<sub>crg1</sub>::kpp4-2 wurde vor (obere Reihe) und nach (untere Reihe) 4 h Wachstum in Arabinose-haltigem Medium Zellaliquots entnommen, mit WGA-TRITC und DAPI behandelt und mit Hilfe von Fluoreszenzmikroskopie untersucht. B) FB2kpp2-GFP wurde 4 h mit DMSO (obere Reihe) oder 2,5 µg/ml synthetischem *a1*-Pheromon (untere Reihe) behandelt und analysiert wie unter A) beschrieben. Die Größenstandards gelten immer für die gesamte Bilderreihe und entsprechen 5 µm.

Zellkern zu finden war (Abb. 26B, obere und untere Reihe). Beide Befunde zeigen, dass Kpp2 vor Aktivierung im Zytoplasma und nach Aktivierung im Zellkern lokalisiert.

## **2.3 Das Kpp4/Fuz7/Kpp2-Modul ist für die pathogene Entwicklung entscheidend**

Die bisher präsentierten Daten haben gezeigt, dass die Komponenten Kpp4, Fuz7 und Kpp2 während der Pheromonantwort in einem Modul agieren. Nachdem aber die Deletion von *fuz7* zu einer dramatischen Reduktion, der Verlust von *kpp2* hingegen aber nur zu einem moderaten Defekt in der Pathogenität führt (Banuett und Herskowitz, 1994a; Mayorga und Gold, 1999; Müller *et al.*, 1999), war es unklar, ob alle Komponenten dieses Moduls auch während der pathogenen Entwicklung genutzt werden. Daher war es von Interesse zu untersuchen, ob *kpp4* während der pathogenen Entwicklung eine Funktion ausübt. Des weiteren sollten nähere Analysen der *kpp4*-, *fuz7*- und *kpp2*-Mutanten folgen, um einen tieferen Einblick in die Aufgaben dieser Komponenten während der pathogenen Entwicklung zu erhalten.

### **2.3.1 *kpp4*- und *fuz7*-Deletionsmutanten sind nicht in der Lage, Pflanzen zu infizieren**

Zur Untersuchung einer möglichen Funktion von *kpp4* während der Infektionsprozesse wurden Mischungen aus kompatiblen *kpp4*-Deletionsmutanten in junge Maispflanzen injiziert. Um einen direkten Vergleich mit *kpp2*- und *fuz7*-Mutanten zu gewährleisten, wurden Maispflanzen auch mit Mischungen aus kompatiblen  $\Delta$ *fuz7*- oder  $\Delta$ *kpp2-1*-Mutanten infiziert. Als Kontrolle diente eine Infektion mit den Wildtypstämmen FB1 und FB2, bei der 90 % der Pflanzen Tumore entwickelten (Tabelle 4). Nach Infektion mit den  $\Delta$ *kpp4*-Mutanten zeigte hingegen keine der Pflanzen Symptome (Tabelle 4). Auch die Mischungen aus FB1 $\Delta$ *fuz7* und FB2 $\Delta$ *fuz7* konnten keine Symptome induzieren (Tabelle 4). Diese vollständige Apathogenität der  $\Delta$ *fuz7*-Mutanten stand im Widerspruch zu publizierten Daten (Banuett und Herskowitz, 1994a), konnte aber durch Dritte mehrmals reproduziert werden (G. Weinzierl, persönliche Mitteilung, A. Brachmann, persönliche Mitteilung). Im Gegensatz dazu waren  $\Delta$ *kpp2-1*-Mutanten in der Lage, bei 20 % der infizierten Pflanzen Tumorbildung auszulösen und zeigten damit eine reduzierte Pathogenität (Tabelle 4), wie es schon beschrieben wurde (Müller *et al.*, 1999; Mayorga und Gold, 1999).

Um auszuschließen, dass der Einfluss von *kpp4*, *fuz7* und *kpp2* auf die pathogene Entwicklung auf einen Fusionsdefekt der Mutanten zurückzuführen ist, wurden die Infektionen mit Derivaten des Stammes SG200 (*a1:mfa2 bE1bW2*) wiederholt. SG200 trägt ein aktives *bE1/bW2*-Genpaar und ist daher in der Lage, ohne vorherige Zellfusion in Maispflanzen Tumore zu induzieren (Tabelle 4). In den Infektionen mit SG200 $\Delta$ *kpp2-1* zeigten noch 9 von 96 infizierten Pflanzen Tumorbildung, wohingegen Pflanzen, die mit SG200 $\Delta$ *kpp4* oder



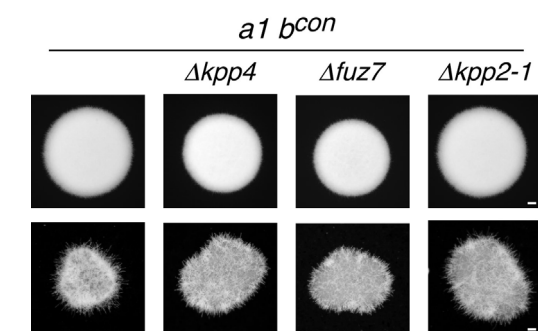
SG200 $\Delta$ fuz7 infiziert wurden, keine Symptome aufwiesen (Tabelle 4). Somit sind sowohl *kpp4*, als auch *fuz7* für die pathogene Entwicklung essenziell. *kpp2* hingegen wird in diesem Stadium ebenfalls benötigt, ist aber nicht absolut notwendig.

**Tabelle 4: Pathogenität der Deletionsmutanten**

Inokulum	Infizierte Pflanzen	Pflanzen mit Tumoren	Tumor-bildung in %
FB1 ( <i>a1 b1</i> ) x FB2 ( <i>a2 b2</i> )	40	36	90
FB1 $\Delta$ kpp4 x FB2 $\Delta$ kpp4	155	0	0
FB1 $\Delta$ fuz7 x FB2 $\Delta$ fuz7	53	0	0
FB1 $\Delta$ kpp2-1 x FB2 $\Delta$ kpp2-1	77	16	20
SG200 ( <i>a1::mfa2 bE1bW2</i> )	40	30	75
SG200 $\Delta$ kpp4	117	0	0
SG200 $\Delta$ fuz7	42	0	0
SG200 $\Delta$ kpp2-1	96	9 <sup>#</sup>	9
HA103 ( <i>a1 b<sup>con</sup></i> )	135	82	60
HA103 $\Delta$ kpp4	156	0	0
HA103	38	32	84
HA103 $\Delta$ fuz7	75	0	0
HA103	40	38	95
HA103 $\Delta$ kpp2-1	40	21	52

<sup>#</sup>Diese Tumore waren ausschließlich an Blättern zu finden und wurden nicht größer als 2 mm im Durchmesser.

Da gezeigt werden konnte, dass der Verlust von *kpp4*, *fuz7* oder *kpp2* die Expression der *b*-Gene beeinträchtigt (siehe 2.1.4.1), die Expression eines kompatiblen bE/bW-Komplexes aber für die pathogene Entwicklung von *U. maydis* absolut notwendig ist, wurde untersucht, ob eine konstitutive Expression eines aktiven bE/bW-Komplexes den Pathogenitätsdefekt aufheben kann. Dafür wurde der Stamm HA103 (*a1 b<sup>con</sup>*), der die Gene *bE1* und *bW2* unter



**Abbildung 27: Phänotyp der Stämme HA103 (*a1 b<sup>con</sup>*), HA103 $\Delta$ kpp4, HA103 $\Delta$ fuz7 und HA103 $\Delta$ kpp2-1.** HA103 und oben angegebenen Derivate wurden alleine auf PD-Aktivkohle-Festmedium aufgetropft (obere Reihe) oder zu Einzelkolonien ausgestrichen (untere Reihe) und 48 h bei 28°C inkubiert. Die Größenstandards entsprechen 1 mm (obere Reihe) und 100 µm (untere Reihe).

der Kontrolle konstitutiver Promotoren exprimiert, herangezogen (Hartmann *et al.*, 1996). Die hergestellten Mutanten HA103 $\Delta$ kpp4, HA103 $\Delta$ fuz7 und HA103 $\Delta$ kpp2-1 zeigten filamentöses Wachstum, das aber im Vergleich mit dem Ausgangsstamm etwas reduziert war (Abb. 27). Das bE1/bW2-Heterodimer kann also auch in Abwesenheit von *kpp4*, *fuz7* oder *kpp2* den typischen morphologischen Wechsel stimulieren und ist damit vermutlich in diesen Stämmen aktiv. Die Pathogenitätstests ergaben, dass HA103 in unabhängigen Experimenten in 60 - 95 % der infizierten Pflanzen Tumorbildung induzieren konnte. An Pflanzen, die mit HA103 $\Delta$ kpp4 oder HA103 $\Delta$ fuz7 infiziert waren, wurden hingegen niemals Symptome

einer Infektion beobachtet (Tabelle 4). Interessanterweise bildeten 52 % der Pflanzen Tumore aus, die mit HA103 $\Delta$ kpp2-1 infiziert wurden (Tabelle 4). Das zeigt, dass die Reduktion der

Pathogenität von den  $\Delta kpp2-1$ -Mutanten durch die konstitutive Expression des b-Heterodimers zum Teil ausgeglichen werden kann.

Kpp4 und Fuz7 haben also während der pathogenen Entwicklung von *U. maydis* Funktion(en) inne, die parallel zu dem b-Heterodimer für die Pathogenität benötigt werden. Die Aufgaben von Kpp2 hingegen liegen vermutlich zum Teil in der Regulation der b-Genexpression.

### 2.3.2 Die Expression von *kpp2AEF* führt zum Pathogenitätsverlust

Kpp2 besitzt im Gegensatz zu Kpp4 und Fuz7 keine essenzielle Funktion für die pathogene Entwicklung. Interessanterweise führt auch der Verlust von *kpp6*, das für eine Kpp2-ähnliche MAPK kodiert (siehe 2.1.3.6), nur zu einer reduzierten Pathogenität (Brachmann *et al.*, 2003). Mischungen von *kpp2/kpp6* Doppelmutanten waren hingegen nicht mehr in der Lage, Pflanzen zu infizieren (Brachmann *et al.*, 2003). Auch die Doppelmutante SG200 $\Delta kpp6$ - $\Delta kpp2-1$  konnten keine Tumore mehr induzieren (Tabelle 5). Damit verhindert also der gleichzeitige Ausfall von *kpp2* und *kpp6* die pathogene Entwicklung, wohingegen die Deletion eines dieser Gene die Pathogenität nur beeinträchtigt. Dies könnte ein Hinweis darauf sein, dass Kpp2 und Kpp6 während der pathogenen Entwicklung partiell redundante Funktionen haben. Auf der anderen Seite könnte man aber einen additiven Effekt annehmen, der durch die Deletion beider Gene hervorgerufen wird. Um zwischen diesen Möglichkeiten unterscheiden zu können, wurde die Pathogenität der *kpp2AEF*- und *kpp2K50R*-Stämme untersucht, da in diesen Stämmen zwar noch Kpp2-Protein vorhanden ist, aber diese Varianten zur Signalweiterleitung nicht mehr in der Lage sind. Eine solche Situation sollte die mögliche Redundanz zwischen Kpp2 und Kpp6 verhindern.

**Tabelle 5: Pathogenität der *kpp2*-Mutanten**

Inokulum	Infizierte Pflanzen	Pflanzen mit Tumoren	Tumor-bildung in %
SG200	30	26	86
SG200 $\Delta kpp6\Delta kpp2-1$	40	0	0
FB1 x FB2	40	35	87
FB1kpp2WT x FB2kpp2WT	40	38	95
FB1kpp2AEF x FB2	36	18	50
FB1kpp2AEF x FB2kpp2AEF	76	2 <sup>#</sup>	3
FB1kpp2K50R x FB2kpp2K50R	158	107	68
SG200	64	58	91
SG200kpp2WT	40	37	80
SG200kpp2AEF	115	0	0
SG200kpp2K50R	161	43	27

<sup>#</sup> Diese Tumore waren ausschließlich an Blättern zu finden und wurden nicht größer als 2 mm im Durchmesser.

In den Pflanzeninfektionen konnten Mischungen aus den Kontrollstämmen FB1kpp2WT und FB2kpp2WT 95 % der Pflanzen erfolgreich infizieren, die Kombination aus FB1kpp2K50R und FB2kpp2K50R zeigte eine leicht reduzierte Pathogenität (65 % der infizierten Pflanzen wiesen Tumore auf, siehe Tabelle 5). Im Gegensatz dazu konnten Kombinationen aus kompatiblen *kpp2AEF*-Stämmen nur in zwei Pflanzen je einen Tumor an den

Blättern induzieren (Tabelle 5). Diese beiden Tumore waren mit weniger als 2 mm Durchmesser deutlich kleiner als Tumore, die durch Wildtyp-Infektionen ausgelöst werden. Da die Mischung aus FB1kpp2AEF und FB2 noch in 50 % der Pflanzen Tumorbildung auslösen konnte (Tabelle 5), ist *kpp2AEF* wahrscheinlich kein dominant-negatives Allel.

In den Infektionen mit SG200kpp2AEF zeigte keine der infizierten Pflanzen Symptome, wohingegen SG200kpp2K50R in 27 % und SG200kpp2WT in 80 % der Pflanzen Tumorbildung stimulierten. Die dramatische Reduktion der Pathogenität der *kpp2AEF*-Stämme kann also nicht auf ein Defekt in der Zell/Zellfusion zurückgeführt werden.

Diese Pflanzeninfektionen zeigen damit, dass die Expression einer inaktiven Kpp2-Variante, Kpp2AEF, die Ausbildung von Krankheitssymptomen verhindert. Damit kann die beobachtete Pathogenität der *Δkpp2-1*-Stämme auf Redundanz zwischen Kpp2 und Kpp6 zurückgeführt werden. Überraschenderweise, spielt die Kinaseaktivität von Kpp2 während der pathogenen Entwicklung eine untergeordnete Rolle.

### **2.3.3 Die Integrität des Kpp4/Fuz7/Kpp2-Moduls ist für die Ausbildung der Infektionsstrukturen essenziell**

Die Infektion der Maispflanzen durch *U. maydis* erfolgt üblicherweise durch das Penetrieren der Epidermis junger Blätter. Dabei differenziert sich das filamentös wachsende Dikaryon in Appressorien-ähnliche Strukturen. Diese Infektionsstrukturen bilden sich in der Regel 12 bis 24 Stunden nach Infektion auf dem dritten oder vierten Folgeblatt der jungen Maispflanze aus. Zwei bis drei Tage nach Infektion reagiert die Pflanze auf eine erfolgreiche Penetration mit Anthocyan-Bildung, die in der Nähe der Injektionsstellen zu beobachten ist. Interessanterweise beobachtete man nach Infektionen mit *Δkpp4*-, *Δfuz7*- oder *kpp2AEF*-Stämmen niemals eine solche Pflanzenreaktion. Dies ließ vermuten, dass diese Mutanten nicht in der Lage waren, die Pflanze zu penetrieren. Daher wurde nun untersucht, welches Stadium der Infektion in diesen Mutanten gestört ist. Um die Notwendigkeit einer Zellfusion zu umgehen, wurde in diesen Untersuchungen mit den Derivaten der haploid-solopathogenen Stämme SG200 und HA103 gearbeitet.

Ein und zwei Tage nach Infektion wurden die dritten und vierten Folgeblätter isoliert und mit Calcoflour behandelt, um die Pilzzellen auf der Blattoberfläche anzufärben. Calcoflour färbt die pilzliche Zellwand und kann durch Epifluoreszenz nachgewiesen werden. Während SG200 und HA103 auf der Pflanzenoberfläche Filamente ausbildeten, die sich zum Teil in Infektionsstrukturen differenzierten, entwickelten nur wenige Zellen der Mutanten SG200*Δkpp4*, SG200*Δfuz7*, SG200kpp2AEF, HA103*Δkpp4* und HA103*Δfuz7* Filamente und es konnten in keinem Falle Infektionsstrukturen beobachtet werden (nicht gezeigt). Diese Beobachtungen lassen vermuten, dass die Mutanten auf der Pflanze in der Filament- und Appressorienbildung gestört sind. Weitere Färbemethoden wie z.B. Chlorazol Black, die es erlauben würden die pilzlichen Filamente auf und in der Pflanze zu färben konnten nicht an-

gewendet werden, da während dieser Prozeduren die Mutanten-Zellen von der Blattoberfläche abgewaschen wurden, wohingegen Zellen von SG200, sowie von HA103 auch nach rigorosen Behandlungen auf der Oberfläche haften blieben (nicht gezeigt).

Um die Ausbildung der Infektionsstrukturen vergleichend untersuchen zu können, wurden Mischinfektion mit SG200 und SG200 $\Delta$ kpp4 oder SG200kpp2AEF vorgenommen. In beiden Kombinationen exprimierte einer der Stämme GFP unter der Kontrolle des starken *otef*-Promotors. In der Kontrollinfektion mit SG200P<sub>otef</sub>:GFP und SG200 zeigten ungefähr 50 % der identifizierten Infektionsstrukturen auch GFP-Fluoreszenz (Tabelle 6). In den Mischungen von SG200P<sub>otef</sub>:GFP mit entweder SG200 $\Delta$ kpp4 oder SG200kpp2AEF konnte man in allen Infektionsstrukturen grüne Fluoreszenz detektieren (Tabelle 6). In den reziproken Kombinationen (SG200 mit SG200 $\Delta$ kpp4/P<sub>otef</sub>:GFP oder SG200kpp2AEF/P<sub>otef</sub>:GFP) zeigte keine der identifizierten Infektionsstrukturen GFP-Fluoreszenz (Tabelle 6). Diese Beobachtungen lassen vermuten, dass Kpp4, Fuz7 und Kpp2 für die Ausbildung von Infektionsstrukturen benötigt werden.

**Tabelle 6: Quantifizierung der Infektionsstrukturen**

Inokulum	Anzahl der gezählten Infektionsstrukturen <sup>§</sup>	Infektionsstrukturen, die GFP exprimieren
SG200 + SG200P <sub>otef</sub> :GFP	32	17
SG200 $\Delta$ kpp4 + SG200P <sub>otef</sub> :GFP	37	37
SG200 + SG200 $\Delta$ kpp4/P <sub>otef</sub> :GFP	40	0
SG200kpp2AEF + SG200P <sub>otef</sub> :GFP 3	5	35
SG200 + SG200kpp2AEF/P <sub>otef</sub> :GFP	31	0

<sup>§</sup> Infektionsstrukturen wurden auf mindestens zehn verschiedenen Pflanzen gezählt.

## 2.4 Welche Komponenten sind an der Aktivierung der Kpp4/Fuz7/Kpp2-MAPK-Kaskade beteiligt?

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass die Kpp4/Fuz7/Kpp2-MAPK-Kaskade an der Weiterleitung des Pheromonsignals beteiligt ist. Das Pheromonsignal muss dabei also vom Pheromonrezeptor zu der MAPKKK Kpp4 übertragen werden. In diesem Abschnitt werden Experimente beschrieben, die untersuchen, ob eines der bekannten G-Proteine zwischen dem Pheromonrezeptor und der MAPK-Kaskade einzuordnen sein könnte.

### 2.4.1 Weder Gpa3 noch Bpp1 agieren oberhalb der Kpp4/Fuz7/Kpp2-MAPK-Kaskade

Die Pheromonrezeptoren Pra1 und Pra2 werden der Familie der Sieben-Transmembran-Rezeptoren zugeordnet. Diese Proteine sind die in der Regel an heterotrimere G-Proteine gekoppelt, die nach Ligandenbindung in eine  $\alpha$ -Untereinheit und ein  $\beta/\gamma$ -Dimer dissoziieren und das Signal an Effektorproteine weiterleiten. In *U. maydis* sind bisher zwar vier  $\alpha$ -Untereinheiten identifiziert worden, aber nur Gpa3 scheint für die Paarungskompetenz wichtig zu sein (Regenfelder *et al.*, 1997). Zusätzlich wurde auch die  $\beta$ -Untereinheit Bpp1 charakterisiert,

deren Verlust ebenfalls die Paarungskompetenz beeinträchtigt (Müller *et al.*, 2003b). Da aber der Kreuzungsdefekt in *gpa3*- sowie *bpp1*-Deletionsmutanten durch Zugabe von cAMP aufgehoben werden konnte, wurden sie in den cAMP-Signalweg eingeordnet (Krüger *et al.*, 1998; Müller *et al.*, 2003b). Es war aber nicht auszuschließen, dass eine dieser Komponenten zusätzlich auf die MAPK-Kaskade wirkt, dies aber von dem starken Einfluss auf den cAMP-Signalweg überlagert wird. So kann z.B. die Konjugationshyphenbildung der *gpa3*- oder *bpp1*-Mutanten nicht untersucht werden, da beide Stämme filamentös wachsen. Um dieses Problem zu umgehen, wurde  $\Delta gpa3$ - und  $\Delta bpp1$ -2-Stämme in cAMP-haltigem Medium angezogen. Als Kontrollen dienten FB2, der ohne cAMP gewachsen war, sowie folgende Stämme, die ebenfalls mit 6 mM cAMP angezogen wurden: FB2, FB2 $\Delta fuz7$  sowie die *pra1*-Mutante RK1786 (*a1* $\Delta$ *pra1* *b2*). Nach fünf Stunden Stimulation mit synthetischem Pheromon entwickelten ohne cAMP 82 % der FB2-Zellen Konjugationshyphen, wohingegen in Anwesenheit von cAMP nur noch 17 % reagierten (Tabelle 7). Exogenes cAMP inhibiert also die Konjugationshyphenbildung, verhindert sie aber nicht vollständig. In den Ansätzen mit

**Tabelle 7: Konjugationshyphenbildung<sup>a</sup>**

Stamm	Anzahl der Zellen	Konjugationshyphenbildung in %
FB2	320	82
FB2 + 6 mM cAMP	351	17
FB2 $\Delta gpa3$ + 6 mM cAMP	319	18
FB2 $\Delta bpp1$ -2 + 6 mM cAMP	360	17
FB2 $\Delta fuz7$ + 6 mM cAMP	371	0
RK1786 + 6 mM cAMP	382	0

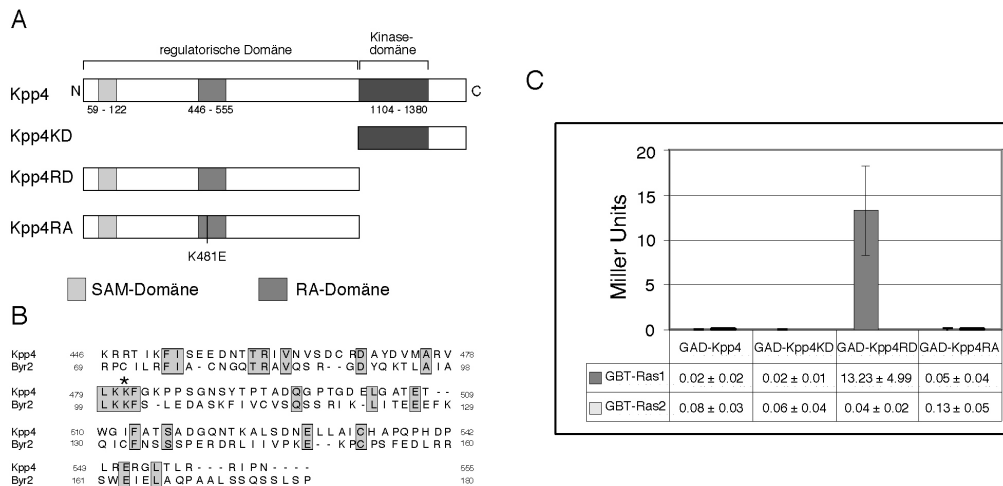
<sup>a</sup>Die Zellen wurden 5 h mit synthetischem *a2*- oder *a1*-Pheromon behandelt und die Konjugationshyphenbildung wurde mittels Mikroskopie bestimmt.

FB2 $\Delta gpa3$  und FB2 $\Delta bpp1$ -2 entwickelten 18 bzw. 17 % der Zellen Konjugationshyphen (Tabelle 7). Diese Stämme verhalten sich damit vergleichbar wie der parentale Stamm FB2 in Anwesenheit von cAMP. Im Gegensatz dazu zeigten weder FB2 $\Delta fuz7$ , noch RK1786 eine

Antwort (Tabelle 7). Gpa3 und Bpp1 sind somit nicht für die Konjugationshyphenbildung notwendig, wenn die cAMP-assoziierten Phänotypen supprimiert werden. Es ist deshalb unwahrscheinlich, dass diese Komponenten auf die MAPK-Kaskade wirken.

## 2.4.2 Die Ras-Interaktionsdomäne spielt für die Funktion von Kpp4 eine wichtige Rolle

In der regulatorischen Domäne von Kpp4 befindet sich eine so genannte RA-Domäne. Es war bekannt, dass RA-Domänen Interaktionen mit kleinen G-Proteinen der Ras-Familie vermitteln (Ponting und Benjamin, 1996), und diese Interaktion für die Aktivierung der Kinase eine wichtige Rolle spielt. In *S. pombe* ist eine solche Interaktion zwischen Ras1 und der MAPKKK Byr2 für die Paarungskompetenz wichtig (Tu *et al.*, 1997). In *U. maydis* sind zwei verschiedene Gene, *ras1* und *ras2*, isoliert worden, die für Ras-Proteine kodieren (Lee und Kronstad, 2002; Müller *et al.*, 2003a). Mit Hilfe des klassischen „Two-Hybrid“-Systems (Fields und Song, 1989) wurde daher untersucht, mit welchem dieser Ras-Proteine Kpp4 interagieren kann.

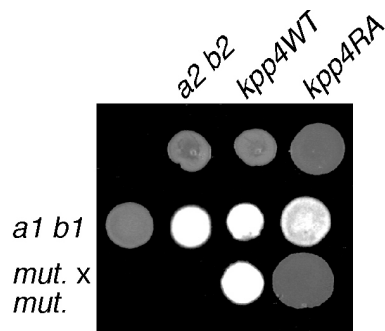


**Abbildung 28: Die regulatorische Domäne von Kpp4 interagiert mit Ras1.** **A)** Schematische Darstellung von Kpp4. Die dargestellten Bereiche von Kpp4 wurden als GAD-Fusionsproteine in die Analyse eingesetzt. Kpp4RA trägt den Aminosäureaustausch K481E. **B)** Vergleich der RA-Domäne von Byr2 aus *S. pombe* und Kpp4. Die konservierte Aminosäure K481 ist mit einem Stern versehen. **C)**  $\beta$ -Galaktosidase-Aktivitäten der verschiedenen Hefetransformanten. Dargestellt ist der Mittelwert und die Standardabweichung von je zwei Messungen fünf unabhängiger Klone. Die reziproken Kombinationen ergaben vergleichbare Werte und in Kombinationen mit leeren Vektoren konnte keine *LacZ*-Reporterogenaktivität nachgewiesen werden (nicht gezeigt).

Dabei wurden jeweils Ras1 und Ras2 als Fusion mit der Gal4-Bindedomäne (GBT) und Kpp4, Kpp4RD (regulatorische Domäne, aa 1 - 964) oder Kpp4KD (katalytische Domäne, aa 1053 - 1566) als Fusion mit der Gal4-Aktivierungsdomäne (GAD) in *S. cerevisiae* koexprimiert (Abb. 28A). Eine Western-Analyse zeigte, dass alle Proteine exprimiert wurden (nicht gezeigt). Die Quantifizierung der  $\beta$ -Galaktosidase-Aktivität ergab, dass Ras1 aber nicht Ras2 mit der regulatorischen Domäne von Kpp4 interagieren kann (Abb. 28C). Interessanterweise konnte keine Interaktion zwischen Ras1 und dem gesamten Kpp4-Protein nachgewiesen werden. Um festzustellen, ob die RA-Domäne in Kpp4 die Interaktion mit Ras1 vermittelt, wurde in die RA-Domäne eine Mutation eingeführt, die den Aminosäureaustausch K481E zu Folge hat (Abb. 28A und B). Der analoge Austausch in Byr2 von *S. pombe* führte zum Verlust der Bindung an Ras1 (Abb. 28B; Tu *et al.*, 1997).

Die Kombination dieser Variante GAD-Kpp4RA mit GBT-Ras1 war nicht mehr in der Lage die Reporterogenaktivität zu stimulieren (Abb. 28C). Eine Westernanalyse ergab, dass das GAD-Kpp2RA-Fusionsprotein in vergleichbarer Menge zu GAD-Kpp4RD exprimiert wird (nicht gezeigt). So macht dieses Ergebnis es wahrscheinlich, dass Ras1 an die RA-Domäne von Kpp4 binden kann.

Diese K481E-Mutation ermöglicht es nun, den Einfluss der RA-Domäne auf die Funktion von Kpp4 *in vivo* zu bestimmen. Dafür wurde das *kpp4*-Allel in FB1 und FB2 entweder durch  $P_{tef1}:kpp4^{K481E}$  oder durch  $P_{tef1}:kpp4^{WT}$ , als Kontrolle, ersetzt. Beide Allele waren damit unter der Kontrolle des konstitutiven *tef1*-Promotors.



**Abbildung 29: Kreuzungsverhalten der *kpp4RA*-Stämme.** Die oben angegebenen Stämme sind FB2 (*a2 b2*) und Derivate. Sie wurden entweder alleine (obere Reihe), mit FB1 (*a1 b1*; mittlere Reihe) oder mit der jeweiligen Mutante (untere Reihe) auf PD-Aktivkohle-Festmedium aufgetropft und 48 h bei 28°C inkubiert.

In Kreuzungsexperimenten waren die Kontrollstämme FB1kpp4WT und FB2kpp4WT von den Ausgangsstämmen FB1 und FB2 nicht zu unterscheiden (Abb. 29). Im Gegensatz dazu zeigte die Mischung aus kompatiblen *kpp4*<sup>K481E</sup>-Stämmen (FB1kpp4RA und FB2kpp4RA) keine Ausbildung der dikaryotischen Filamente, obwohl sie noch in der Lage waren mit dem Wildtyp zu fusionieren (Abb. 29). In dieser Hinsicht zeigen die *kpp4*<sup>K481E</sup>-Stämme einen ähnlichen Phänotyp wie die  $\Delta kpp4$ -Mutanten.

Stimulierte man aber FB1kpp4RA mit synthetischem Pheromon, so zeigten 19 % der Zellen eine Antwort, wogegen in der Kontrolle 96 % Konjugationshyphen ausbildeten (Tabelle 8). In Pflanzeninfektionsexperimenten zeigte sich, dass

Mischungen aus kompatiblen *kpp4*<sup>K481E</sup>-Mutanten in 40 %, die Kontrollinfektion hingegen in 86 % der infizierten Pflanzen Symptome induzieren konnten (Tabelle 9). Somit besitzen zwar die *kpp4*<sup>K481E</sup>-Stämme noch die Fähigkeit auf Pheromon zu reagieren und die pathogene Entwicklung zu durchlaufen, sind aber im Vergleich zum Wildtyp deutlich abgeschwächt.

**Tabelle 8: Konjugationshyphenbildung der *kpp4RA*-Mutante<sup>a</sup>**

Stamm	Anzahl der Zellen	Konjugationshyphenbildung in %
FB1kpp4WT	340	96
FB1kpp4RA	318	19

<sup>a</sup>Die Zellen wurden 5 h mit synthetischem *a2*-Pheromon behandelt und die Konjugationshyphenbildung wurde mittels Mikroskopie bestimmt.

Zusammenfassend lassen diese Befunde den Schluss zu, dass eine funktionelle RA-Domäne in Kpp4 für eine volle Aktivierung der MAPK-Kaskade notwendig ist. Da Ras1 mit der regulatorischen Domäne von Kpp4 interagiert, impliziert dies eine Funktion von Ras1 während der Aktivierung von Kpp4.

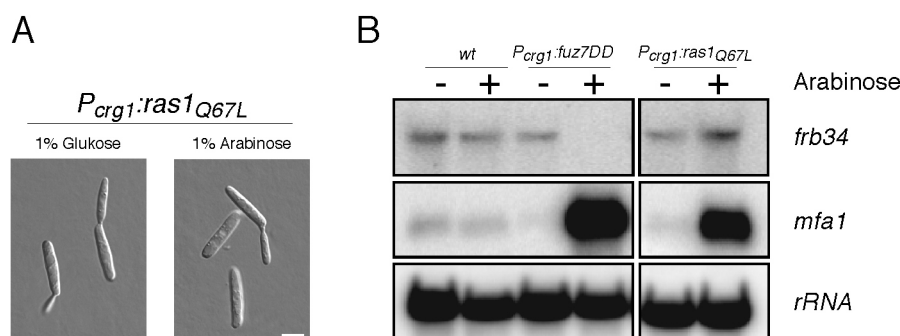
**Tabelle 9: Pflanzeninfektionen mit *kpp4RA*-Stämmen**

Inokulum	Infizierte Pflanzen	Pflanzen mit Tumoren	Tumorbildung
FB1kpp4WT x FB2kpp4WT	44	38	86 %
FB1kpp4RA x FB2kpp4RA	37	15	40 %

### 2.4.3 Die Expression des dominant-aktiven *ras1*<sub>Q67L</sub> stimuliert die Pheromongenexpression

Um die potentielle Funktion von Ras1 oberhalb der MAPK-Kaskade zu bestätigen, wurde ein dominant-aktives Allel von *ras1* konstruiert. Dafür wurde in *ras1* eine Punktmutation eingeführt, die den Aminosäureaustausch Q67L zur Folge hat. Es war bekannt, dass ein solcher Austausch den Verlust der intrinsischen GTPase-Aktivität verursacht und damit Ras-Proteine konstitutiv-aktiv macht (Wiseman *et al.*, 1986). Dieses *ras1*<sub>Q67L</sub>-Allel wurde unter Kontrolle des regulierbaren *crg1*-Promotors in den *ip*-Locus von FB1 eingebracht. In Glukose-haltigem Medium wuchs der so hergestellte Stamm FB1P<sub>crg1</sub>:*ras1*<sub>QL</sub> durch Knospung (Abb. 30A). Überraschenderweise konnten nach Überführung in Arabinose-haltiges Medium keine Veränderungen in der Morphologie festgestellt werden (Abb. 30A), auch nicht nach Inkubationszeiten von bis zu über sechzehn Stunden (nicht gezeigt). Die Expression von *ras1*<sub>Q67L</sub> hat also keinen offensichtlichen Einfluss auf die Zellmorphologie.

Eine Northern-Analyse zeigte, dass die Expression von *ras1*<sub>Q67L</sub> die *mfa1*-Transkription stark induziert (Abb. 30B). Die Expression des dominant-aktiven *ras1*<sub>Q67L</sub> führt also zu einer Stimulation der Pheromongenexpression, nicht aber zu einem morphologischen Wechsel und unterscheidet sich damit von Stämmen, die dominant-aktive Allele von *kpp4* oder *fuz7* exprimieren (siehe 2.1.3.1 und 2.1.3.4). In Bezug auf die Expression des Gens *frb34* detektierte man nach Expression von *ras1*<sub>Q67L</sub> eine zweifach erhöhte Transkriptmenge (Abb. 30B). Nach Aktivierung der MAPK-Kaskade war hingegen eine Repression von *frb34* beobachtet worden (Abb. 30B; siehe 2.1.3.5).



**Abbildung 30: *ras1*<sub>Q67L</sub> hat keinen Einfluss auf die Morphologie, stimuliert aber die *mfa1*-Transkription.** A) FB1P<sub>crg1</sub>:*ras1*<sub>Q67L</sub> wurde in Glukose- und Arabinose-haltigem Medium über Nacht angezogen. Der Größenstandard entspricht 5 µm. B) Northern-Analyse von FB1P<sub>crg1</sub>:*ras1*<sub>Q67L</sub>. Die oben angegebenen Stämme wuchsen in Anwesenheit von Glukose (-) und 5 h in Arabinose-haltigem Medium (+). 10 µg Gesamt-RNA wurde pro Spur geladen und die Filter wurden mit den Sonden, die auf der rechten Seite angegeben sind, hybridisiert. Dabei diente die *rRNA* als Ladekontrolle.

Diese Ergebnisse machen es unwahrscheinlich, dass aktiviertes Ras1 positiv auf die Aktivität von Kpp4 wirkt und damit die MAPK-Kaskade aktiviert. Die beobachtete Interaktion von



Ras1 und Kpp4 spielt also vermutlich für die Aktivierung der Kinase *in vivo* keine direkte Rolle. Interessanterweise wurde beobachtet, dass eine intermediäre Aktivierung des cAMP-Signalwegs, die noch keinen offensichtlichen Einfluss auf die Zellmorphologie hat, zu einer drastischen Induktion der *mfa*-Transkription und zu einer leichten Stimulation der *frb34*-Expression führt (Brachmann *et al.*, 2001; Krüger *et al.*, 1998). Daher erscheint es möglich, dass aktiviertes Ras1 positiv auf eine Komponente des cAMP-Signalwegs wirkt.

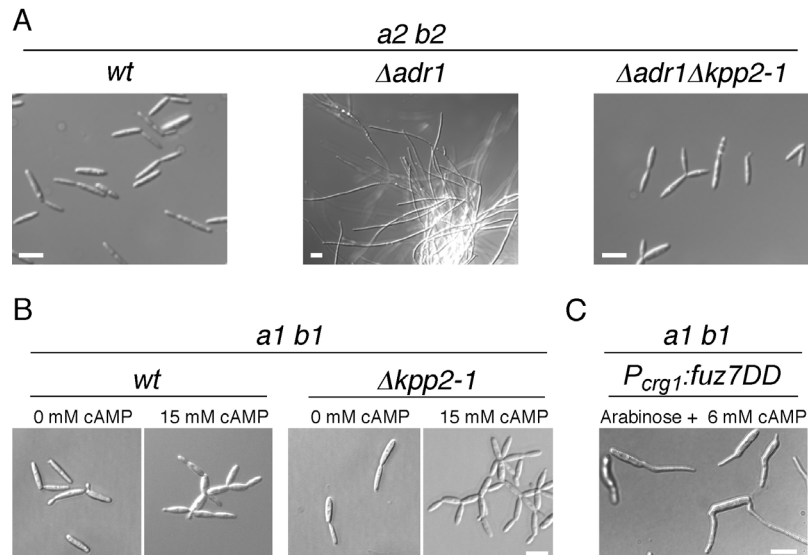
## 2.5 Analyse der Kommunikation zwischen der MAPK-Kaskade und dem cAMP-Signalweg

Der cAMP/PKA-Signalweg spielt eine entscheidende Rolle beim Wechsel von hefeartigem zu filamentösem Wachstum. Hohe PKA-Aktivität fördert Knospungswachstum, niedrige PKA-Aktivität führt hingegen zu einem filamentösen Phänotyp (Barrett *et al.*, 1993; Dürrenberger *et al.*, 1998). So wachsen Mutanten, in denen die Adenylatzyklase Uac1 nicht aktiv ist, filamentös (Barrett *et al.*, 1993). Interessanterweise wurden alle Komponenten der Kpp4/Fuz7/Kpp2-MAPK-Kaskade ebenfalls als *ubc4*, *ubc5* bzw. *ubc3* identifiziert, da sie Mutationen komplementieren konnten, die den filamentösen Phänotyp der Adenylatzyklase-Mutanten supprimierten (Andrews *et al.*, 2000; Mayorga und Gold, 1999). Diese Ergebnisse zeigen, dass für das filamentöse Wachstum, das durch niedrige intrazelluläre cAMP-Konzentrationen bedingt ist, eine intakte MAPK-Kaskade benötigt wird. Auch an der Regulation der Paarungstyplocusgene sind beide Signalwege beteiligt (Hartmann *et al.*, 1999; Krüger *et al.*, 1998; Müller *et al.*, 1999). Diese Beobachtungen deuteten auf direkte Verknüpfungen zwischen der MAPK-Kaskade und dem cAMP-Signalweg hin. Daher wurden verschiedene genetische Ansätze verfolgt, diese Verbindungen näher zu untersuchen.

### 2.5.1 Ein aktivierter cAMP-Signalweg beeinflusst die Zellmorphologie unabhängig von Kpp2

In Adenylatzyklasemutanten sollte die PKA auf Grund des sehr niedrigen cAMP-Spiegels inaktiv sein. Damit wären Zielproteine der PKA hypophosphoryliert und dies führt zu dem filamentösen Wachstum. Es ist durchaus vorstellbar, dass das MAPK-Modul den intrazellulären cAMP-Spiegel oder die Aktivität der PKA direkt beeinflussen könnte. Kpp2 könnte so z.B. ein Aktivator der Phosphodiesterase sein und/oder einen Inhibitor der PKA darstellen und damit Einfluss auf die Zellmorphologie nehmen. Kpp2 wäre dann epistatisch zu *Adr1*, der katalytischen Untereinheit der PKA. Wenn dies zuträfe, sollte eine  $\Delta kpp2-1\Delta adr1$ -Doppelmutante den gleichen Phänotyp wie eine  $\Delta adr1$ -Mutante aufweisen. Aus diesem Grund wurde eine solche Doppelmutante hergestellt und auf ihre Morphologie hin untersucht. Im Gegensatz zu  $\Delta adr1$ -Einzelmutanten, zeigten die  $\Delta kpp2-1\Delta adr1$ -Doppelmutanten kein filamentöses Wachstum, sondern teilten sich durch Knospung (Abb. 31A). Interessanterweise zeigten diese Stämme eine Tendenz zwei Knospen auf einer Seite auszubilden (Abb. 31A),

ein Phänotyp den man auch beim Wildtyp beobachten kann, wenn dieser in 6 mM cAMP gewachsen ist (Krüger *et al.*, 1998). Dieser Phänotyp der  $\Delta kpp2-1 \Delta adr1$ -Doppelmutanten lassen den Schluss zu, dass die Kommunikation zwischen Kpp2 und dem cAMP-Signalweg unterhalb der PKA stattfinden muss. So ist vorstellbar, dass Kpp2 ein Effektor der PKA ist, z.B. durch die Aktivierung einer Kpp2 spezifischen-Phosphatase. In diesem Fall sollte die MAPK-Kaskade aber für die Antwort auf eine aktive cAMP-Kaskade benötigt werden und/oder cAMP die durch *fuz7DD* induzierte Filamentbildung inhibieren.



**Abbildung 31: Analyse der Interaktion zwischen Kpp2 und Adr1.** **A)** Kpp2 agiert nicht oberhalb von Adr1. FB2 (*wt*) und Derivate wurden über Nacht in Flüssigmedium bei 28°C inkubiert. Die Größenstandards entsprechen 10 µm. **B)** Kpp2 wird für die morphologische Antwort auf eine aktive cAMP-Kaskade nicht benötigt. FB1 (*wt*) und FB1 $\Delta kpp2-1$  wurden über Nacht in Flüssigmedium ohne und mit 15 mM cAMP bei 28°C inkubiert. Der Größenstandard entspricht 10 µm und gilt für alle Aufnahmen. **C)** cAMP kann die durch *fuz7DD*-induzierte Filamentbildung nicht inhibieren. FB1 $P_{crg1}:fuz7DD$  wurde über Nacht in Glukose-haltigem Flüssigmedium mit 6 mM cAMP bei 28°C inkubiert und die *fuz7DD*-Expression wurde durch 5 h Inkubation bei 28°C in Arabinose-haltigem Flüssigmedium bei Anwesenheit von 6 mM cAMP induziert. Der Größenstandard entspricht 10 µm.

Als erstes wurde die Auswirkungen von hohen cAMP-Konzentrationen auf die Morphologie getestet. Wildtyp-Zellen, die in Anwesenheit von 15 mM cAMP in Flüssigmedium wuchsen, entwickeln einen Zytokinesedefekt (Abb. 31B). Bei  $\Delta kpp2-1$ -Mutanten beobachtete man die gleiche Antwort (Abb. 31B). *kpp2* wird somit für die morphologische Antwort auf einen erhöhten cAMP-Spiegel nicht benötigt. Des weiteren konnte die Expression von *fuz7DD* auch in Anwesenheit von 6 mM cAMP die Ausbildung von Filamenten stimulieren (Abb. 31C). Diese Ergebnisse zeigen, dass der Einfluss eines aktiven cAMP-Signalwegs auf die Zellmorphologie nicht über Kpp2 läuft.

Neben der Regulation der Zellmorphologie hat der cAMP-Signalweg auch einen Einfluss auf die Entwicklung des Pilzes in der Pflanze. *U.-maydis* Stämme, die das dominant-aktive Allel

*gpa3<sub>Q206L</sub>* tragen und somit einen aktivierten cAMP-Signalweg besitzen, sind in ihrer Sporenbildung stark eingeschränkt und die von diesen Stämmen induzierten Pflanzentumore bleiben grün (Krüger *et al.*, 2000). Bei Pflanzeninfektionen mit Mischungen aus FB1Δ*kpp2*-1 und FB2*gpa3<sub>Q206L</sub>*Δ*kpp2*-1 waren in allen induzierten Tumoren nur wenige Sporen zu finden und waren damit von denen, die durch Mischungen aus FB1 und FB2*gpa3<sub>Q206L</sub>* verursacht wurden, nicht zu unterscheiden (Tabelle 10). Dies zeigt, dass *kpp2* auch in dieser Hinsicht kein Effektor des cAMP-Signalwegs ist. Eine weitere Beobachtung war, dass die Tumorbildung der Infektion mit FB1Δ*kpp2*-1 und FB2*gpa3<sub>Q206L</sub>*Δ*kpp2*-1 mit 20 % vergleichbar war mit Infektionen durch Δ*kpp2*-1 Einzelmutanten (siehe 2.3.1.) Die reduzierte Pathogenität der *kpp2*-Mutanten kann also nicht durch *gpa3<sub>Q206L</sub>* aufgehoben werden.

**Tabelle 10: Pathogenität der Doppelmutanten in Kpp2 und cAMP-Signalweg**

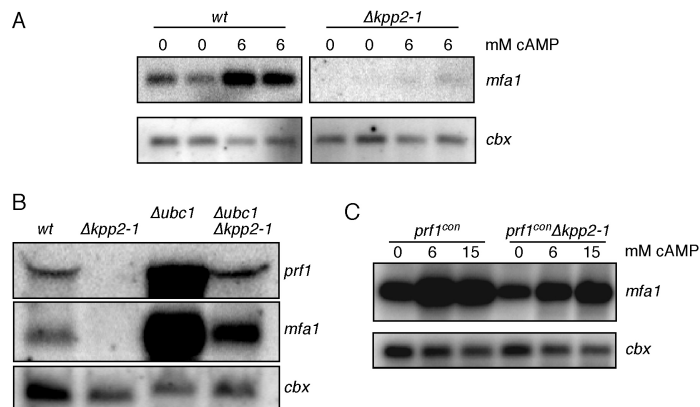
Inokulum	Infizierte Pflanzen	Pflanzen mit Tumoren	Tumorbildung
FB1 x FB2	32	30	93 %
FB1 x FB2 <i>gpa3<sub>QL</sub></i>	40	34 <sup>#</sup>	85 %
FB1Δ <i>kpp2</i> -1 x FB2 <i>gpa3<sub>QL</sub></i> Δ <i>kpp2</i> -1	38	7 <sup>#</sup>	18 %
FB1 x FB2Δ <i>kpp2</i> -1	18	17	95 %
FB1 x FB2Δ <i>adr1</i>	20	15	75 %
FB1 x FB2Δ <i>kpp2</i> -1Δ <i>adr1</i>	35	3	8 %

<sup>#</sup> Diese Tumore blieben grün und es waren kaum Sporen zu finden.

Zusammenfassend sprechen diese Ergebnisse dafür, dass die Morphologie von *U. maydis* einer antagonistischen Regulation durch den cAMP-Signalweg und der MAPK-Kaskade unterliegt und diese Koregulation unterhalb der beiden Kinasen Kpp2 und Adr1 erfolgen muss. Für die Phänotypen, die durch eine aktivierte cAMP-Kaskade hervorgerufen werden, ist Kpp2 entbehrlich und somit in dieser Hinsicht kein Effektor der PKA. Kpp2 wird aber für das filamentöse Wachstum, das Stämme mit einem niedrigen intrazellulären cAMP-Spiegel zeigen, absolut benötigt.

## 2.5.2 Die Zell-Zellfusion unterliegt der Kontrolle des cAMP-Signalwegs und der MAPK-Kaskade

Eine weitere Aufgabe des cAMP-Signalwegs ist die Regulation der *a*-Gene. Ein aktivierter cAMP-Signalweg stimuliert die *mfa1*-Genexpression ebenso wie das aktivierte Kpp2/Fuz7/Kpp2-MAPK-Modul. So induziert die Anwesenheit von 6 mM cAMP im Wachstumsmedium oder die Deletion von *ubc1*, wodurch die PKA konstitutiv-aktiv wird, die *mfa1*- und *prf1*-Transkription (Abb. 32A, Abb. 32B; Krüger *et al.*, 1998; Hartmann *et al.*, 1999). Daher wurde untersucht, ob *kpp2* für diese Regulation benötigt wird. Nach Zugabe von 6 mM cAMP konnte in FB1Δ*kpp2*-1 keine Induktion der *mfa1*-Expression detektiert werden (Abb. 32A). Eine Δ*ubc1*Δ*kpp2*-1-Doppelmutante zeigte eine mit dem Wildtyp FB1 vergleichbare Menge an *mfa1*- und *prf1*-Transkripten (Abb. 32B). Diese Transkriptmengen waren deutlich höher als in FB1Δ*kpp2*-1, aber drastisch niedriger als in FB1Δ*ubc1*. Der Einfluss der PKA auf die *mfa1*- und *prf1*-Genexpression scheint also nicht direkt über Kpp2 zu laufen. Da Δ*kpp2*-1-



**Abbildung 32: cAMP-induzierte *mfa1*-Genexpression in *Δkpp2-1*-Mutanten.** A) FB1 (*wt*) und FB1 $\Delta$ *kpp2-1* wurden 16 h ohne oder mit 6 mM cAMP in Flüssigmedium angezogen. B) Die Stämme wurden vor der RNA-Präparation auf Aktivkohlehaltigen-Festmedium bei 28°C 48 h inkubiert. C) Die Stämme wurden in 0, 6 oder 15 mM cAMP 16 h in Flüssigmedium angezogen. Die Spuren wurden mit je 10  $\mu$ g RNA beladen und die Northern-Filter mit den rechts angegebenen Sonden hybridisiert, *cbx* diente dabei als Ladekontrolle.

Mutanten einen Defekt in der *prf1*-Expression aufweisen, wurde nun die cAMP-induzierte *mfa1*-Expression in FB1 $prf1^{con}\Delta$ *kpp2-1* untersucht. In diesem Stamm war die basale *mfa1*-Expression erhöht und konnte durch Zugabe von cAMP weiter gesteigert werden (Abb. 32C). *kpp2* wird also für die cAMP-induzierte *mfa1*-Expression nicht benötigt, wenn sichergestellt ist, dass die Zellen *prf1* exprimieren.

Prf1 besitzt neben MAPK-Phosphorylierungsstellen auch PKA-Phosphorylierungsstellen, die für die Aktivität des Proteins wichtig sind (M. Feldbrügge, persönliche Mitteilung; siehe auch 2.1.3.7). Es ist deshalb wahrscheinlich, dass Adr1 die

Aktivität von Prf1 direkt reguliert. Prf1 integriert also vermutlich die Aktivität der cAMP-Signalkaskade und des MAPK-Moduls. Es ist daher möglich, dass beide Wege gemeinsam an der Regulation der Pheromonantwort und somit der Zell-Zellfusion beteiligt sind. Unter dieser Annahme sollten Mutationen in beiden Kaskaden zu einer größeren Beeinträchtigung der Zell-Zellfusion führen, als die entsprechenden Einzel-Mutationen. Um dies zu untersuchen, wurden Pflanzeninfektionen mit FB1 in Kombination mit FB2 $\Delta$ *kpp2-1* oder FB2 $\Delta$ *adr1* und aus FB1 und der Doppelmutante FB2 $\Delta$ *kpp2-1\Delta**adr1* vorgenommen. Für eine erfolgreiche Infektion müssen die Zellen dieser Stämme fusionieren und nach der Fusion sollten die rezessiven Mutationen durch den Wildtyppartner komplementiert werden. Daher ist anzunehmen, dass die Anzahl an induzierten Tumoren die Fusionsfähigkeit der Mutanten widerspiegelt. In diesen Pflanzeninfektionen induzierten Mischungen aus FB1 und FB2 $\Delta$ *kpp2-1*, sowie aus FB1 und FB2 $\Delta$ *adr1* in 95 % bzw. 75 % der Pflanzen Tumore (Tabelle 10). Im Gegensatz dazu konnte die Mischung aus FB1 und der Doppelmutante FB2 $\Delta$ *kpp2-1\Delta**adr1* nur in 8 % der Pflanzen Tumorbildung auslösen (Tabelle 10). Die Doppelmutante weist also eine deutlich stärkere Reduktion in der Fusionsfähigkeit auf als die Einzelmutanten. Das deutet darauf hin, dass die Fusionsfähigkeit einer synergistischen Regulation beider Signalwege unterliegt und damit wahrscheinlich beide Signalwege gemeinsam an der Weiterleitung des Pheromonsignals beteiligt sind. Da der Verlust von *kpp2* und *adr1* aber nicht zum vollständigen Verlust der Fusionsfähigkeit führte, muss noch mindestens ein dritter Signalweg existieren, der an der Regulation der Zell-Zellfusion beteiligt ist.

### 3 Diskussion

In der vorliegenden Arbeit konnten die Proteinkinasen Kpp4, Fuz7 und Kpp2 in ein MAPK-Modul eingeordnet werden. Diese MAPK-Kaskade ist sowohl an der Weiterleitung des Pheromonsignals, als auch an der Regulation der pathogenen Entwicklung von *U. maydis* beteiligt. Während des Kreuzungsprozesses reguliert sie die transkriptionelle und morphologische Pheromonantwort. Diese beiden Prozesse konnten in dieser Arbeit von einander getrennt werden und es wurde festgestellt, dass sich der Signalweg unterhalb von Kpp2 teilt. Dabei umfasst der eine Zweig das morphologische Programm, der andere reguliert den Transkriptionsfaktor Prf1 und beeinflusst damit die Expression der Paarungstyplocusgene. Während der pathogenen Entwicklung von *U. maydis* wird die Integrität dieses Moduls für die Ausbildung der Infektionsstrukturen benötigt. Interessanterweise scheinen während dieses Entwicklungsschritts die MAP-Kinasen Kpp2 und Kpp6 redundante Funktionen auszuüben. Untersuchungen mit Stämmen, die verschiedene *kpp2*-Allele tragen, deuteten darauf hin, dass die Phosphorylierung von Kpp2 für den Infektionsprozess entscheidend ist, die enzymatische Aktivität aber nicht.

#### 3.1 Die Regulation der Pheromonantwort in *U. maydis* durch die Kpp4/Fuz7/Kpp2-MAPK-Kaskade

Frühere Arbeiten konnten der MAPK Kpp2 und der MAPKK Fuz7 eine Rolle während  $\alpha$ -abhängiger Prozesse zuschreiben. Sowohl *kpp2*-, als auch *fuz7*-Deletionsmutanten entwickeln keine Konjugationshyphen und weisen eine stark reduzierte Dikaryenbildung auf (Banuett und Herskowitz, 1994a; Mayorga und Gold, 1999; Müller *et al.*, 1999). Beide Komponenten wurden aber nicht in eine Kaskade eingeordnet, da die Pheromon-induzierte Expression der Pheromongene in *kpp2*-Mutanten, aber nicht in *fuz7*-Mutanten gestört war (Müller *et al.*, 1999; Regenfelder *et al.*, 1997). Mit der MAPKKK Kpp4 konnte nun eine weitere Komponente charakterisiert werden, die für die Kreuzungsprozesse von *U. maydis* benötigt wird. Nach einem Pheromonstimulus zeigen *kpp4*-Deletionsmutanten keine Konjugationshyphenbildung und kompatible Mutanten waren nicht in der Lage, Dikaryen zu entwickeln. Damit besitzen *kpp4*-Mutanten auf zellulärer Ebene die gleichen Defekte wie *fuz7*- und *kpp2*-Deletionsmutanten. Diese Komponenten konnten nun unter Verwendung von Epistasis-Untersuchungen und biochemischen Analysen in eine Kaskade eingeordnet werden.

##### 3.1.1 Die Kpp4/Fuz7/Kpp2-Kaskade

Schon in der Bäckerhefe *S. cerevisiae* ermöglichten Epistasis-Analysen mittels dominant-aktiven und „loss-of-function“-Allelen die Anordnung verschiedener *STE*-Gene in eine Signal-

kette (Cairns *et al.*, 1992; Stevenson *et al.*, 1992). Auf vergleichbare Weise erlaubten die in dieser Arbeit durchgeführten Epistasis-Analysen in *U. maydis* die Einordnung von Kpp4, Fuz7 und Kpp2 in eine lineare Kaskade. Dabei ermöglichte die regulierte Expression dieser Allele (mittels des *crg1*-Promotors) die Beobachtung der Prozesse, die durch eine aktivierte Kaskade hervorgerufen werden. Die Expression eines dominant-aktiven Alleles von *kpp4* (*kpp4-2*) induzierte in Abhängigkeit der Gene *fuz7* und *kpp2* die Ausbildung Konjugationshyphen-ähnlicher Filamente. Der gleiche morphologische Wechsel wurde auch nach Expression des dominant-aktiven Alleles *fuz7DD* beobachtet und diese Antwort benötigte *kpp2*, aber nicht *kpp4*. Darüber hinaus konnte anhand von verschiedenen *kpp2*-Allelen gezeigt werden, dass für diese Differenzierung sowohl die Kinaseaktivität, als auch die Phosphat-Akzeptor-Stellen im T-Loop von Kpp2 (TxY) unentbehrlich sind. Im Gegensatz dazu wird die Kpp2-ähnliche MAPK Kpp6 für die morphologische Antwort nicht benötigt. Diese Beobachtung bestätigte den Phänotyp der *kpp6*-Deletionsmutanten, die weder in der Konjugationshyphen- noch in der Dikaryenbildung gestört sind (Brachmann *et al.*, 2003).

Um in diesem genetischen Ansatz zu beweisen, dass Kpp2 unterhalb von Fuz7 agiert, wäre ein dominant-aktives Allel von *kpp2* hilfreich gewesen. Der Austausch der Aminosäurereste im T-Loop (TxY) zu Aspartat oder Glutamat sollten zwar eine Phosphorylierung simulieren, diese Substitutionen verleihen den MAP-Kinasen aber keine konstitutive Aktivität. Gründe für dieses Phänomen konnten in der räumlichen Struktur der MAPK gefunden werden (Canagarajah *et al.*, 1997). Die duale Phosphorylierung, aber nicht die Substitution der Aminosäuren, induziert in den MAP-Kinasen umfangreiche Konformationsänderungen. Dies führt zwar zur Ausbildung einer energetisch ungünstigen Konformation, ist aber Voraussetzung für ein aktives katalytisches Zentrum (Canagarajah *et al.*, 1997). Damit unterliegen MAP-Kinasen im Gegensatz zu anderen Proteinkinasen wie z.B. MAPKKK oder cAMP-abhängigen Proteinkinasen keiner typischen Inhibition, sondern einer direkten Aktivierung. Seit Mitte 2001 gibt es Beispiele für konstitutiv-aktive MAP-Kinasen (Bell *et al.*, 2001), eine allgemeine Übertragbarkeit dieser Mutationen auf entfernt verwandte MAP-Kinasen muss aber noch bewiesen werden. So zeigen z.B. Kpp2-Varianten, die diese Aminosäuresubstitutionen besitzen, keine konstitutive Aktivität (H. Eichhorn, persönliche Mitteilung).

Um eine Einordnung von Kpp2 unterhalb von Fuz7 vornehmen zu können, wurden daher biochemische Experimente durchgeführt. Die Expression von *fuz7DD* erhöhte die Kinaseaktivität von Kpp2 *in vivo* und dafür wurden die Phosphat-Akzeptor-Stellen in Kpp2 benötigt. Außerdem interagierte Fuz7 *in vitro* mit Kpp2 und mit Kpp2-Versionen, die keine intakten Phosphat-Akzeptor-Stellen besaßen bzw. enzymatisch inaktiv waren. Eine direkte Phosphorylierung von Kpp2 durch Fuz7 konnte leider im Rahmen dieser Arbeit nicht gezeigt werden, da rekombinante GST-Fuz7-Fusionsproteine nicht aktiv waren. Ein vergleichbares Phänomen wurde auch bei der MAPKK Ste7p aus *S. cerevisiae* beobachtet. Als GST-Fusionsprotein aus *E. coli* war diese Kinase inaktiv, nur ein aus *S. cerevisiae* aufgereinigtes Fusionsprotein besaß enzymatische Aktivität und konnte Fus3p phosphorylieren (Neiman und Herskowitz, 1994).

All diese Daten beweisen, dass Kpp4, Fuz7 und Kpp2 in einem Modul agieren. Da die Mechanismen der Signalweiterleitung innerhalb eines MAPK-Moduls hoch konserviert sind (Widmann *et al.*, 1999), ist anzunehmen, dass Kpp4 die MAPKK Fuz7 durch Phosphorylierung an Serin<sup>259</sup> und Threonin<sup>263</sup> aktiviert und daraufhin Fuz7[pS239pT263] die MAPK Kpp2 im T-Loop an Threonin<sup>182</sup> und Tyrosin<sup>184</sup> phosphoryliert.

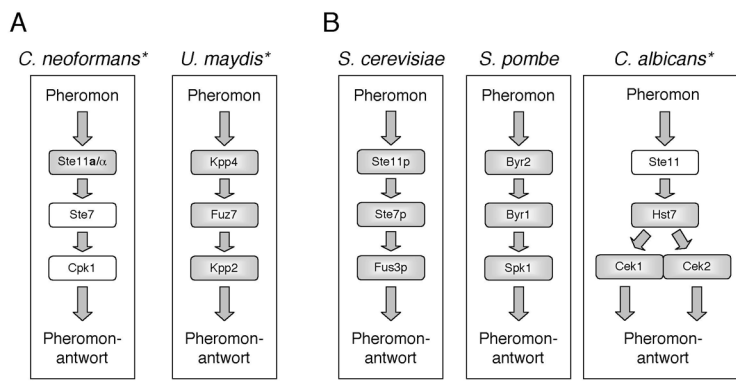
### 3.1.2 Das Kpp4/Fuz7/Kpp2-MAPK-Modul ist an der Übermittlung des Pheromonsignals beteiligt

Nachdem gezeigt wurde, dass *kpp4*, *fuz7* und *kpp2* für die Paarungskompetenz von *U. maydis* benötigt werden und geklärt war, dass Kpp4, Fuz7 und Kpp2 in einer Kaskade agieren, stellte sich die Frage, wie dieses Modul die Paarungskompetenz beeinflusst. Die in dieser Arbeit gemachten Beobachtungen unterstützen ein Modell, in dem dieses Modul direkt an der Weiterleitung des Pheromonsignals beteiligt ist: Die Inaktivierung der Kaskade durch Deletion eines seiner Komponentengene verhinderte die Ausbildung von Konjugationshyphen, auch wenn das stimulierende Pheromon im Überschuss vorhanden war und der Pheromonrezeptor konstitutiv exprimiert wurde. Außerdem löste die genetische Aktivierung des Moduls durch die Expression der dominant-aktiven Allele von *kpp4* oder *fuz7* zelluläre Antworten aus, die auch nach Pheromonstimulation beobachtet werden können: Die Aktivierung der Kaskade induzierte die Ausbildung von Filamenten, die Eigenschaften von Konjugationshyphen aufwiesen. Gleichzeitig war eine gesteigerte Expression der Gene des *a*- und *b*-Locus detektierbar. Schließlich konnte gezeigt werden, dass nach Pheromonstimulation die katalytische Aktivität von Kpp2 erhöht war und diese Aktivierung mit der Akkumulation von Kpp2 im Zellkern einherging. Bei dieser Aktivierungs-abhängigen Translokation spielt wahrscheinlich die MAPKK Fuz7 eine wichtige Rolle. Im Zytoplasma interagiert Kpp2 mit Fuz7 über die D-Box. Nach Phosphorylierung von Kpp2 wird dieser Komplex vermutlich instabil, Kpp2 dimerisiert und wird in den Zellkern transportiert. Dabei könnte Fuz7 inaktivem Kpp2 als zytoplasmatische Verankerung dienen, da in Fuz7 eine putative *nuclear export sequence* (NES, aa 87 - 96, siehe Abb. 10) zu finden ist. Diese Überlegung wird durch die Beobachtung unterstützt, dass bei Überexpression das Kpp2-GFP-Fusionsprotein hauptsächlich im Kern zu finden ist (nicht gezeigt). Eine solche zytoplasmatische Verankerung und Aktivierungs-abhängige Translokalisierung ist für viele verschiedene MAP-Kinasen beschrieben worden und beruht möglicherweise auf konservierten Mechanismen (Adachi *et al.*, 1999; Bardwell *et al.*, 2001; Chen *et al.*, 2001; Fukuda *et al.*, 1997; Fukuda *et al.*, 1996; Khokhlatchev *et al.*, 1998; Nguyen *et al.*, 2002; Pearson *et al.*, 2001; van Drogen und Peter, 2001).

All diese Beobachtungen zusammen machen es sehr wahrscheinlich, dass die Kpp4/Fuz7/Kpp2-MAPK-Kaskade an der Weiterleitung des Pheromonsignals beteiligt ist (Abb. 33A). Aus verschiedenen Pilzen ist bekannt, dass MAPK-Kaskaden an der Regulation der Paarungsprozesse beteiligt sind (Abb. 33A und B). Bisher ist aber nur in *S. cerevisiae* und in

*S. pombe* überzeugend gezeigt worden, dass diese MAPK-Kaskaden das Pheromonsignal direkt übertragen (Aono *et al.*, 1994; Ballard *et al.*, 1991; Cairns *et al.*, 1992; Elion *et al.*, 1993; Errede *et al.*, 1993; Gartner *et al.*, 1992; Gotoh *et al.*, 1993; Neiman *et al.*, 1993; Stevenson *et al.*, 1992; Zhou *et al.*, 1993).

In dem human-pathogenen Pilz *C. albicans* konnte erst kürzlich ein sexueller Zyklus nach-



**Abbildung 33: Die Pheromonsignalweiterleitung über eine MAPK-Kaskade ist konserviert.** Die Pheromonsignalkaskade in Basidiomyceten (A) und in Ascomyceten (B). Die jeweiligen drei Hauptkomponenten der Module sind dargestellt. Komponenten, deren Funktionen experimentell untersucht wurden, sind grau hinterlegt, wohingegen Komponenten, für deren Einordnung noch keine experimentelle Grundlagen existieren, in weißen Kästen dargestellt sind (in Anlehnung an Chen *et al.*, 2002 und Lengeler *et al.*, 2000). Unter den pathogenen Pilzen (Namen sind mit einem Stern versehen) sind nur in *U. maydis* alle Komponenten beschrieben und eingeordnet worden.

gewiesen werden (Hull *et al.*, 2000; Hull und Johnson, 1999; Magee und Magee, 2000) und die MAPKK Hst7 und die zwei eng verwandten MAP-Kinasen Cek1 und Cek2 sind für die Zellfusion entscheidend (Chen *et al.*, 2002; Magee *et al.*, 2002). In *C. neoformans* konnte bisher nur der MAPKKK Ste11α eine Funktion während der Zellfusion zu geschrieben werden (Clarke *et al.*, 2001). Die Mechanismen der Pheromonsignalweiterleitung in Pilzen sind somit hoch konserviert.

Die Situation in *U. maydis* unterscheidet sich dennoch substantiell von der in *S. cerevisiae*,

*S. pombe*, *C. neoformans* oder *C. albicans*. In diesen Pilzen führt ein Funktionsverlust der Kaskade (durch Deletion eines der Komponentengene) zu einem vollständigen Defekt der Zell-Zellfusion. In *U. maydis* hingegen hat ein Funktionsverlust der MAPK-Kaskade nur geringen Einfluss auf diesen Prozess. *kpp4*-, *fuz7*- oder *kpp2*-Deletionsmutanten können mit kompatiblen Wildtypstämmen Entwicklungsschritte durchlaufen, die eine Zell-Zellfusion erfordern: Die Ausbildung von Dikaryen und die Infektion von Pflanzen. Bei weiteren Pflanzeninfektionen wurde deutlich, dass der Prozess der Zellfusion in *U. maydis* der gemeinsamen Kontrolle durch die Kpp4/Fuz7/Kpp2-MAPK-Kaskade und den cAMP-Signalweg unterliegt – beide Signalwege übernehmen aber unterschiedliche Aufgaben. Mischungen von einem Wildtypstamm mit einer  $\Delta$ *adr1*-Mutante, die keine funktionelle PKA besitzt, zeigen eine abgeschwächte Pathogenität (20 - 40 %, diese Arbeit und Dürrenberger *et al.*, 1998),  $\Delta$ *adr1* $\Delta$ *kpp2-1*-Doppelmutanten hingegen konnten nur noch in 8 % der infizierten Pflanzen Tumore induzieren. Diese Beobachtungen entsprechen den Ergebnissen quantitativer Fusionstests. In diesen Ansätzen konnte gezeigt werden, dass die Kompetenz, mit Wildtypzellen zu fusionieren, durch die Deletion von *kpp2* nicht signifikant reduziert ist, wohingegen



der Verlust der Adenylatzyklase Uac1 zu einer 200-fachen Reduktion führt (Mayorga und Gold, 1999; H. Teunissen, persönliche Mitteilung). Damit ist der cAMP-Signalweg – nicht aber die MAPK-Kaskade – für die Pheromon-vermittelte Zellfusion essenziell.

Erst in Mischungen kompatibler *kpp2*-Deletionsmutanten werden die Aufgaben von Kpp2 während des Fusionsprozesses deutlich. In dieser Kombination kommt es 20-mal seltener zu Fusionsereignissen als zwischen entsprechenden Wildtypstämmen (Mayorga und Gold, 1999). Damit besitzen *kpp2*-Mutanten einen bilateralen Fusionsdefekt, der z.B. auf die – durch die Deletion von *kpp2* verursachte – niedrige Pheromongenexpression zurückgeführt werden könnte. In *S. cerevisiae* konnte ein solcher Zusammenhang gezeigt werden, große Mengen an Pheromon sind für eine erfolgreiche Fusion erforderlich (Brizzo *et al.*, 1996). Auf der anderen Seite ist vorstellbar, dass für eine effiziente Zellfusion beide Partner Konjugationshyphen ausbilden müssen. In den Mischungen mit Wildtypstämmen ( $\Delta kpp2-1 + wt$ ) kann der Wildtyppartner noch gerichtet wachsen und somit  $\Delta kpp2-1$ -Zellen finden, um mit ihnen zu fusionieren. Können aber beide Partner nicht aufeinander zuwachsen ( $\Delta kpp2-1 + \Delta kpp2-1$ ), werden Fusionsereignisse seltener. Diese Überlegung setzt voraus, dass gerichtetes Wachstum auf die Pheromonquelle zu, für die Fusion eine wichtige Rolle spielt. Diese Hypothese könnte, in Anlehnung an Arbeiten in Hefe, durch einen Pheromon-Konfusions-Test geprüft werden (Valtz *et al.*, 1995). In diesem Test werden die Fusionsereignisse zweier Partner in Anwesenheit eines Überschusses an exogenem Pheromon gemessen; unter diesen Bedingungen sollte ein gerichtetes Wachstum verhindert werden.

Nachdem der gleichzeitige Verlust der beiden Signalwege keinen vollständigen Fusionsdefekt zur Folge hatte, muss in *U. maydis* neben der MAPK-Kaskade und dem cAMP-Signalweg noch mindestens ein dritter Signalweg an der Regulation der Zell-Zellfusion beteiligt sein. Bisher ist keine Signalkomponente bekannt, die in diesem zusätzlichen Weg eingeordnet werden könnte; einen detaillierten Einblick in diesen Prozess würde eine Mutagenese der  $\Delta adr1 \Delta kpp2$ -Doppelmutante ermöglichen. Die gesuchten Mutanten würden nicht mehr mit einem Wildtypstamm fusionieren und daher in entsprechenden Mischungen apathogen sein. Die Kandidaten sollten aber noch Pheromon produzieren, so dass alle uninteressanten Mutanten, die in der Expression, Reifung oder Sekretion des Pheromons defekt sind, aussortiert werden können. Die Funktionalität dieses genetischen Ansatzes wäre durch die Identifikation von Mutanten gezeigt, die einen defekte Pheromonrezeptor besitzen.

### **3.1.3 Die Kpp4/Fuz7/Kpp2-MAPK-Kaskade reguliert die Expression der *a*- und *b*-Gene durch zwei unterschiedliche Mechanismen**

In dieser Arbeit konnte heraus gearbeitet werden, wie die Signalweiterleitung über das Kpp4/Fuz7/Kpp2-Modul an der transkriptionellen Regulation der *a*- und *b*-Gene beteiligt ist. Die Aktivierung von Kpp2 *in vivo* (durch die Expression von *fuz7DD*) stimuliert die Expression eines PRE-Reportergens und führt in Abhängigkeit von der Kpp2-Kinaseaktivität zu

einer starken Induktion der Transkription von *prf1*, sowie der *a*- und *b*-Gene. Wird *prf1* hingegen konstitutiv exprimiert, zeigt sich, dass die MAPK-Kaskade die Transkription der *a*- und *b*-Gene auf unterschiedliche Weise reguliert. Die Expression der *a*-Gene wird indirekt stimuliert, indem die Transkription von *prf1* erhöht wird, die Aktivierung der *b*-Gene unterliegt dagegen einer direkten Kontrolle der Aktivität des Prf1-Proteins durch posttranskriptionelle Modifikation. Konsistent mit diesen Beobachtungen war aktiviertes Kpp2 nicht mehr in der Lage, die Transkription der *b*-Gene zu stimulieren, wenn in Prf1 alle putativen MAPK-Phosphorylierungsstellen zerstört waren; die Induktion von *prf1* und der Gene des *a*-Locus war hingegen in einer solchen Situation möglich. Die durch diese Resultate postulierte direkte Modifikation von Prf1 durch Kpp2 konnte in einem *in vitro* Kinasetest gezeigt werden. Damit ist anzunehmen, dass Kpp2 Prf1 auch *in vivo* direkt phosphoryliert und diese Modifikation die Aktivität von Prf1 an den Promotoren der *b*-Gene steigert.

Der positive Einfluss der MAPK-Kaskade auf die *prf1*-Transkription wird hingegen wahrscheinlich zum Teil über einen anderen Transkriptionsfaktor vermittelt. Im Promotor von *prf1* befinden sich neben zwei PRE-Boxen, über die Prf1 seine eigene Transkription reguliert, die palindromischen Sequenzen der UAS (*upstream activating sequence*), die für die *prf1*-Expression essentiell sind (Hartman *et al.*, 1999). Es konnten bisher drei verschiedene potentielle Transkriptionsfaktoren (Ncp1-3) beschrieben werden, deren Überexpression die Expression von *prf1* stimulierte, die aber nicht für die Aktivität des *prf1*-Promotors essentiell waren. (A. Hartmann, persönliche Mitteilung und Hartmann *et al.*, 1999). Vorstellbar ist, dass einer dieser Faktoren ein Zielprotein von Kpp2 ist, über das die MAPK-Kaskade die Transkription von *prf1* stimuliert.

### **3.1.4 Während der Pheromonantwort wird die Aktivität des Transkriptionsfaktors Prf1 durch Kpp2 und Adr1 reguliert**

Der Verlust von *kpp4*, *fuz7* oder *kpp2* hatte zur Folge, dass keine Pheromon-induzierte *b*-Genexpression beobachtet wurde, aber weder Kpp4, Fuz7 noch die Kinaseaktivität von Kpp2 wurden für die Pheromon-induzierte *a*-Genexpression benötigt. Damit spielt die Pheromon-signalweiterleitung über die MAPK-Kaskade für die Pheromon-induzierte *a*-Genexpression keine Rolle. Konsistent mit dieser Schlussfolgerung beobachtet man auch in Stämmen, die Prf1-Varianten exprimieren, die nicht mehr von Kpp2 modifiziert werden können, eine normale Pheromon-induzierte *a*-Genexpression (M. Feldbrügge, persönliche Mitteilung). Damit muss mindestens eine weitere Signalkaskade an der Weiterleitung des Pheromon-signals auf Prf1 beteiligt sein. Mehrere Beobachtung sprechen dafür, dass diese Aufgabe der cAMP-Signalweg übernimmt. Zum einen zeigen Stämme, die keine funktionelle cAMP-Kaskade besitzen (wie z.B. *uac1*- und *gpa3*-Deletionsmutanten), Defekte in der basalen sowie Pheromon-induzierten *mfal*-Transkription (Krüger *et al.*, 1998; Regenfelder *et al.*, 1997). Zum anderen führt eine Stimulierung der cAMP-Kaskade zu einer erhöhten Pheromongen-

expression, auch wenn *prf1* konstitutiv exprimiert wird (Hartmann *et al.*, 1999; Krüger *et al.*, 1998). Darüber hinaus kann Prf1 von der cAMP-abhängigen Proteinkinase Adr1 phosphoryliert werden und diese Modifikation ist für die Pheromon-induzierte Genexpression wichtig (M. Feldbrügge, persönliche Mitteilung). Der Pheromonstimulus wird also wahrscheinlich auch durch Adr1 mittels direkter Modifikation auf Prf1 übertragen. Damit unterliegt Prf1 der gemeinsamen Kontrolle von Adr1 und Kpp2.

Interessanterweise wurde in dieser Arbeit beobachtet, dass eine aktivierte MAPK-Kaskade die *b*-Genexpression nicht mehr induzieren konnte, wenn in Prf1 die PKA-Phosphorylierungsstellen zerstört waren. Eine Modifikation dieser Aminosäurepositionen ist also entweder für die Grundaktivität von Prf1 entscheidend oder Voraussetzung für eine Modifikation von Prf1 durch Kpp2. In diesem Zusammenhang ist bemerkenswert, dass zwei zentrale PKA-Phosphorylierungsstellen in Prf1 mit der putativen MAPK-Interaktionsdomäne (D-Box) überlappen. Daraus ergibt sich die interessante Möglichkeit, dass die Modifizierung dieser Aminosäurereste durch Adr1 eine Voraussetzung für die Bildung des Kpp2-Prf1-Enzym-Substrat-Komplexes ist.

Für die Regulation der *a*- und *b*-Gen-Expression während der Pheromonantwort kann nunmehr folgendes Modell aufgestellt werden: Unter Bedingungen, die in *U. maydis* den Paarungsprozess begünstigen, wird *prf1* exprimiert. An dieser Regulation ist vermutlich sowohl die MAPK-, als auch die cAMP-Kaskade beteiligt. Kpp2 reguliert über noch nicht definierte Faktoren (vielleicht eines der Ncp-Proteine) die Expression von *prf1* und Adr1 sorgt durch eine basale Phosphorylierung für eine Grundaktivität von Prf1. Damit wird Prf1 empfänglich für weitere Modifikationen. Der Pheromonstimulus des Partners führt dann zur Aktivierung der cAMP- und der MAPK-Kaskade, daraufhin phosphorylieren sowohl Adr1 als auch Kpp2 Prf1 und stimulieren damit die Expression der *a*- bzw. der *b*-Gene.

Es ist zum gegenwärtigen Zeitpunkt nicht klar, welcher Mechanismus der unterschiedlichen Aktivität von Prf1 an den *a*- bzw. *b*-Promotoren zu Grunde liegt. Eine Möglichkeit wäre allerdings, dass die Phosphorylierung durch Adr1 die Transaktivierungseigenschaften von Prf1 fördert und damit die Expression der *a*-Gene stimuliert. Die zusätzliche Modifikationen durch Kpp2 könnten es Prf1 ermöglichen, weitere Faktoren zu den *b*-Promotoren zu rekrutieren, die für die Aktivierung dieser Promotoren notwendig sind. Aus der Bäckerhefe ist bekannt, dass der Faktor Ste12p, der analog zu Prf1 in *U. maydis* an PRE-Boxen bindet und die basale sowie Pheromon-induzierte Genexpression vermittelt (Hagen *et al.*, 1991), an verschiedenen Promotoren auf unterschiedliche Weise agiert. Befinden sich in einem Promotor multiple PRE-Boxen, so kann Ste12p als Homo-Multimer binden und nach Aktivierung die Transkription stimulieren. Sind hingegen nur einzelne PRE-Boxen vorhanden, bindet Ste12p nur schwach und benötigt für die transkriptionelle Aktivierung zusätzliche Transkriptionsfaktoren, wie Mcm1p oder Tec1p (Dolan *et al.*, 1989; Yuan *et al.*, 1991). Diese akzessorischen Faktoren bilden mit Ste12p Heterodimere aus und binden in solchen Promotoren an Elemente (MCE bzw. TCS), die benachbart zu den PRE-Boxen liegen (Errede und Ammerer,

1989; Madhani und Fink, 1997). In diesem Zusammenhang ist interessant, dass in *U. maydis* der Aufbau der Promotoren des *a*- und *b*-Locus sehr unterschiedlich ist. So befinden sich im Falle der *a*-Gene, *mfa1* und *prf1*, die PRE-Boxen zum Teil vielfach wiederholt 150 - 350 bp vor der Translationsinitiationsstelle, wohingegen im *b*-Locus die PRE-Boxen im 3'-Bereich von *bE* und im Intron von *bW* zu finden sind (Urban *et al.*, 1996b). Somit ist durchaus vorstellbar, dass neben Prf1 weitere Transkriptionsfaktoren an der Expression der *b*-Gene beteiligt sind und diese vielleicht ebenfalls durch die MAPK Kpp2 reguliert werden.

### **3.1.5 Die MAPK Kpp2 hat während der Pheromonantwort eine Kinase-unabhängige Funktion**

Wie im vorherigen Kapitel diskutiert wurde, wird die Signalweiterleitung über die Kpp4/Fuz7/Kpp2-MAPK-Kaskade für die Pheromon-induzierte *a*-Genexpression nicht benötigt. Kpp2 übernimmt allerdings eine Sonderrolle, es ist für eine normale Expression der *a*-Gene erforderlich, jedoch ohne seine katalytische Funktion dabei zu gebrauchen. Im Gegensatz zu Stämmen, die die katalytisch-inaktive Variante Kpp2K50R exprimierten, zeigten *kpp2*-Deletionsmutanten eine reduzierte basale sowie Pheromon-stimulierte *mfa1*-Transkription. Weiterführende Experimente konnten dann zeigen, dass die Kinase-unabhängige Funktion von Kpp2 für eine normale Expression von *prf1* benötigt wird. *kpp2*-Deletionsmutanten hatten eine reduzierte *prf1*-Expression und ihr Defekt in der basalen sowie Pheromon-induzierten *a*-Genexpression konnte durch eine konstitutive Expression von *prf1* kompensiert werden. Allerdings war die nicht-aktivierbare Variante Kpp2AEF nicht in der Lage, die Kinase-unabhängige Funktion auszuüben; *kpp2AEF*-Mutanten wiesen ebenfalls einen Defekt in der *prf1*- und *a*-Genexpression auf. Dieses Ergebnis war überraschend, da nicht erwartet wurde, dass sich Kpp2AEF von nicht-phosphoryliertem Kpp2 (in Abwesenheit von Fuz7) unterscheidet. Diese Beobachtung macht aber deutlich, dass sich der Mechanismus der Kinase-unabhängigen Funktion von Kpp2 grundlegend von den bisher bekannten, Kinase-unabhängigen Funktionen der MAP-Kinasen p38 aus *H. sapiens* und Kss1p aus *S. cerevisiae* unterscheiden muss. Diese MAP-Kinasen können auch als nicht-phosphorylierbare Varianten (analoge Versionen zu Kpp2AEF) ihre Kinase-unabhängigen Funktionen ausüben. Beide Proteine inhibieren dabei ihre Zielproteine durch direkte Interaktion: Die MAPK p38 interagiert mit der Proteinkinase Mirk und Kss1p interagiert mit dem Transkriptionsfaktor Ste12p (Bardwell *et al.*, 1998; Cook *et al.*, 1997; Lim *et al.*, 2002; Madhani *et al.*, 1997).

Es ist anzunehmen, dass der Mechanismus die Kinase-unabhängige Funktion von Kpp2 ebenfalls auf einer direkten Interaktion mit einem Zielprotein beruht. Prinzipiell sind zwei Gruppen von Zielproteinen denkbar, Repressoren der *prf1*-Expression, die durch direkte Interaktion mit Kpp2 inhibiert werden, oder Aktivatoren der *prf1*-Expression, auf die sich eine Interaktion mit Kpp2 positiv auswirkt. In diesem Zusammenhang ist interessant, dass in dieser Arbeit eine relativ starke Interaktion von Kpp2 und Prf1 gezeigt werden konnte. Diese

wird auf der Seite von Prf1 vermutlich durch eine so genannte „Docking“-Domäne vermittelt, die sich aus einer D-Box und einem FxFxP-Motiv zusammensetzt und in mehreren Transkriptionsfaktoren für die selektive Interaktion mit einer MAPK benötigt werden (Sharrocks *et al.*, 2000). Darüber hinaus ist bekannt, dass Prf1 seine eigene Transkription reguliert (Hartmann *et al.*, 1996). Damit könnte Prf1 ein Zielprotein der Kinase-unabhängigen Funktion von Kpp2 sein. Auch unstimuliertes Kpp2 hätte in diesem Modell durch direkte Interaktion einen positiven Einfluss auf die Aktivität des Prf1-Proteins. Unterstützt wird diese Überlegung durch die Beobachtungen, dass Kpp2-GFP-Fusionsproteine auch im nicht stimulierten Zustand im Zellkern zu finden sind. Auf welche Weise könnte die Interaktion mit Kpp2 die Aktivität von Prf1 positiv beeinflussen? Einige Hinweise sprechen dafür, dass die Stabilität von Prf1 ein kritischer Parameter ist. Zum einen besitzt Prf1 PEST-Sequenzen, die das Protein der Proteolyse zuführen könnten, zum anderen konnte Prf1 bisher auch nach transkriptioneller Überexpression in *U. maydis* nicht reproduzierbar dargestellt werden (A. Hartmann, F. Karfarnik, M. Leibundgut, persönliche Mitteilungen). Eine durch Proteolyse verursachte kurze Halbwertszeit von Transkriptionsfaktoren ist nicht ungewöhnlich, und es ist durchaus vorstellbar, dass die Interaktion zwischen Kpp2 und Prf1 die Stabilität von Prf1 erhöht. In diesem Modell würde Prf1 ohne Interaktion mit Kpp2 schneller abgebaut werden und als Folge würde man eine geringere Menge an *prf1*- und *mfa1*-Transkripten beobachten. Eine Überexpression von *prf1* könnte diesen Defekt ausgleichen. Entsprechend der beobachteten *prf1*- und *mfa1*-Transkriptionsniveaus in *kpp2K50R*- und *kpp2AEF*-Stämmen, sollte nach diesem Modell Kpp2K50R, aber nicht Kpp2AEF mit Prf1 interagieren können. Mit dieser Prämisse könnte das hier aufgestellte Modell mit geeigneten Experimenten relativ leicht auf seine Richtigkeit geprüft werden.

### 3.1.6 Die Kpp4/Fuz7/Kpp2-MAPK-Kaskade reguliert die Konjugationshyphenbildung unabhängig von Prf1 und der cAMP-Signalkaskade

Neben der Expression der *a*- und *b*-Gene stimuliert Pheromon in *U. maydis*-Zellen auch die Ausbildung von Konjugationshyphen. Ihre Entwicklung ist charakterisiert durch den Wechsel von dem bipolaren Knospungsmuster der unstimulierten Zellen zu einem monopolaren, filamentösem Wachstum der Konjugationshyphen (Snetselaar *et al.*, 1996).

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass die Aktivierung der MAPK-Kaskade (durch Expression von *kpp4-2*, *kpp4PS* oder *fuz7DD*) ausreichend war, die Ausbildung von Filamenten zu stimulieren, die wie Konjugationshyphen „geschlängelt“ wuchsen und über die gesamte Länge mit dem Agglutinin WGA, das an kurze Chitinketten bindet, angefärbt werden konnten. Die Filamente, die durch die Expression eines aktiven b-Heterodimers ausgelöst werden, sind hingegen gerade und starr und werden durch WGA nur an der Hyphenspitzen markiert. Die Zellwand der b-induzierten Filamente wächst also nur an der Hyphenspitze, in Konjugationshyphen hingegen ist die Zellwand vermutlich über die gesamte Hyphe

dynamisch. Es ist durchaus vorstellbar, dass diese besondere Zellwandstruktur es den Konjugationshyphen ermöglicht, sich innerhalb weniger Minuten nach einer neuen Pheromonquelle auszurichten (Snetselaar *et al.*, 1996).

In dieser Arbeit wurde offensichtlich, dass der zentrale Regulator Prf1 für die Regulation dieses morphologischen Wechsels nicht benötigt wird, wohingegen er für die transkriptionelle Antwort absolut erforderlich ist. Wurden *prf1*-Deletionsmutanten, in denen der Pheromonrezeptor Pra2 konstitutiv exprimiert wird, mit exogenem Pheromon stimuliert, entwickelten sie Konjugationshyphen, die aber keine Pheromon-induzierte Genexpression aufweisen. Prf1 ist damit für die Expression der Pheromon- und Rezeptorgene und ihre Pheromon-induzierte Stimulation essenziell, aber nicht direkt an der Regulation der Konjugationshyphenbildung beteiligt.

Weitere Analysen machten deutlich, dass die Signalweiterleitung über den cAMP-Signalweg ebenfalls für die transkriptionelle Pheromonantwort, aber nicht für die Ausbildung der Konjugationshyphen entscheidend ist. Für diese Untersuchung war es erforderlich, im ersten Schritt den morphologischen Defekt, sowie die erniedrigte *a*-Genexpression der *gpa3*-Deletionsmutanten durch Zugabe von cAMP zu kompensieren. Stimulierte man die so vorbehandelten Mutanten mit Pheromon, so konnte die Ausbildung von Konjugationshyphen beobachtet werden. Ebenso entwickelten Stämme, die auf Grund des dominant-aktiven Allels *gpa3<sub>QL</sub>* einen aktivierten cAMP-Weg besitzen, nach Pheromonstimulus die Bildung von Konjugationshyphen. Diese Beobachtungen zeigen, dass die Pheromonsignalweiterleitung über den cAMP-Signalweg für den morphologische Wechsel nicht benötigt wird. In allen hier beschriebenen Situationen eines aktivierten cAMP-Signalwegs war aber die Effizienz der Konjugationshyphenbildung stark beeinträchtigt. Eine vergleichbare Effizienzreduktion konnte auch bei Wildtypstämmen beobachtet werden, die in Anwesenheit von cAMP mit Pheromon stimuliert wurden. Damit hat eine dauerhafte Aktivität der Kaskade eine inhibierende Wirkung auf die Entwicklung von Konjugationshyphen. Dies könnte ein Hinweis darauf sein, dass in der natürlichen Situation die Aktivität der Kinase Adr1 nach Pheromonstimulus schnell aber lediglich transient zunimmt. Die Aktivierung von Kpp2 hingegen sollte länger andauernd sein. Entsprechend dieser Vorstellung detektiert man schon wenige Minuten nach Stimulation eine erhöhte Menge an *mfa1*-Transkripten, die *b*-Geninduktion sowie die Ausbildung der Konjugationshyphen wird hingegen erst zu späteren Zeitpunkten (2-4 Stunden) beobachtet.

Mit der Identifizierung verschiedener Regelkreise kann die Pheromonantwort in *U. maydis* eindeutig von der in *S. cerevisiae* abgegrenzt werden. In *S. cerevisiae* existiert vermutlich nur ein Hauptregelkreis. Der Transkriptionsfaktor Ste12p reguliert die morphologische sowie transkriptionelle Pheromonantwort. Nach Pheromonstimulation zeigen auch *ste12*-Mutanten, in denen die Pheromonrezeptoren überexprimiert wurden, weder einen Zellzyklusarrest, noch eine morphologische oder transkriptionelle Antwort (Roberts *et al.*, 2000). Interessanterweise kann aber der Defekt der *ste12*-Mutanten, nach Pheromonstimulation keinen Zellzyklusarrest

zu initiieren, durch eine Überexpression des Zellzyklusregulators Far1p kompensiert werden (Oehlen *et al.*, 1996). Damit unterliegt zumindest der Pheromon-abhängige Zellzyklusarrest in *S. cerevisiae* einem zweiten unabhängigen Regelkreis.

Über den Mechanismus des Pheromon-induzierten Zellzyklusarrests in der G<sub>2</sub>-Phase ist in *U. maydis* noch recht wenig bekannt (J. Perez-Martin, persönliche Mitteilung). In dieser Arbeit wurde aber deutlich, dass die Kpp4/Fuz7/Kpp2-MAPK-Kaskade an der Regulation des Zellzyklusarrests beteiligt ist. Die jeweiligen Deletionsmutanten proliferieren auch in Anwesenheit von Pheromon und in den Filamenten, die durch die Expression der dominant-aktiven Allele hervorgerufen wurden, befand sich immer nur ein Zellkern – auch nach mehr als 24 h Induktion. Darin unterscheidet sich die dauerhafte Aktivierung der MAPK-Kaskade von einer andauernden Pheromonstimulation, an die sich die Zellen nach 6 - 8 h anpassen können und wieder anfangen, die Mitose zu durchlaufen (J. Perez-Martin, persönliche Mitteilung; Spellig *et al.*, 1994). Dies lässt vermuten, dass in der Situation einer genetisch aktivierten MAPK-Kaskade keine effiziente Adaption stattfindet. Damit sollten die entscheidenden Desensibilisierungsmechanismen in der Signalkaskade oberhalb von Kpp2 wirken.

### **3.2 Die Regulation der pathogenen Entwicklung durch die Kpp4/Fuz7/Kpp2-MAPK-Kaskade**

#### **3.2.1 Die Signalweiterleitung über das Kpp4/Fuz7/Kpp2-MAPK-Modul entscheidet über die pathogene Entwicklung**

*U. maydis* infiziert die Maispflanzen üblicherweise durch Penetration der Epidermis junger Blätter. Dabei differenziert sich das filamentös wachsende Dikaryon in Appressorien-ähnliche Strukturen. In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass die beiden Komponenten *kpp4* und *fuz7* für diesen Differenzierungsprozess entscheidend sind. *kpp4*- und *fuz7*-Deletionsmutanten sind apathogen, auch in Situationen, in denen eine Zell-Zellfusion keine Voraussetzung für die Infektion ist. Auf der Pflanze entwickeln diese Mutanten zwar noch Filamente, es wurde aber niemals die Entwicklung von Appressorien-ähnlichen Infektionsstrukturen beobachtet.

Der Deletion von *kpp2* hingegen führt zu keinem vollständigen Verlust der Pathogenität. Damit war unklar, ob Kpp2 auch während der pathogenen Entwicklung unterhalb von Fuz7 agiert (Mayorga und Gold, 1999; Müller *et al.*, 1999). Durch die Verwendung des nicht-phosphorylierbaren Allels *kpp2AEF* konnte aber Kpp2 unterhalb von Kpp4 und Fuz7 eingeordnet werden. Diese Schlussfolgerung wird klar, wenn man sich überlegt, dass der Verlust von Kpp4 oder Fuz7 zu nicht-phosphoryliertem Kpp2 führen sollte und Stämme, die diese Variante exprimieren, apathogen sind. Nähere Untersuchung machten deutlich, dass *kpp2AEF*-Mutanten keine Infektionsstrukturen ausbilden können und damit den gleichen Phänotyp wie *kpp4*- und *fuz7*-Deletionsstämme aufweisen. Die Signalweiterleitung über Kpp4, Fuz7 und Kpp2 ist also für die Ausbildung der Infektionsstrukturen unentbehrlich.

In diesem Zusammenhang war es erstaunlich, dass die konstitutive Expression aktiver bE1/bW2-Heterodimere (die zentralen Regulatoren der pathogenen Entwicklung) die Pathogenität der *kpp4*- und *fuz7*-Deletionsmutanten nicht wieder herstellen konnte. Damit ist davon auszugehen, dass Kpp4 und Fuz7 neben der Regulation der *b*-Gene noch weitere Aufgaben inne haben, die für die pathogene Entwicklung entscheidend sind. Eine dieser Aufgaben könnte z.B. die Ausbildung der Appressorien sein, da auch die *kpp4*- oder *fuz7*-Deletionsmutanten, die aktive b-Heterodimere exprimieren, auf der Pflanzenoberfläche keine Appressorien ausbilden. Entsprechend dieser Schlussfolgerung sollte die konstitutive Expression von bE1 und bW2 ebenfalls nicht in der Lage sein, den Pathogenitätsdefekt der *kpp2AEF*-Mutanten aufzuheben.

Mit diesen Ergebnissen wird deutlich, dass die Kpp4/Fuz7/Kpp2-MAPK-Kaskade an zwei verschiedenen Entwicklungsschritten von *U. maydis* beteiligt ist, der Pheromonantwort und der frühen Infektionsphase.

### **3.2.2 Die MAPK Kpp2 und Kpp6 haben während der pathogenen Entwicklung redundante und spezifische Funktionen**

Dass *kpp2*-Deletionsmutanten im Gegensatz zu *kpp2AEF*-Mutanten nur eine reduzierte Pathogenität aufweisen, kann durch eine partielle Redundanz zwischen Kpp2 und Kpp6 erklärt werden. *kpp6*-Mutanten sind wie  $\Delta kpp2-1$ -Mutanten in ihrer Pathogenität reduziert (Brachmann *et al.*, 2003),  $\Delta kpp2-1\Delta kpp6$ -Doppelmutanten sind hingegen apathogen. Unter Verwendung der nicht-aktivierbaren Variante Kpp6AEF, konnte gezeigt werden, dass die Aktivierung von Kpp6 nicht für die Ausbildung der Infektionsstrukturen, sondern für die Penetration der Pflanzenoberfläche benötigt wird (Brachmann *et al.*, 2003). Damit haben Kpp2 und Kpp6 während der pathogenen Entwicklung unterschiedliche Aufgaben, können aber zum Teil gegenseitige Funktionen übernehmen. Diese Redundanz beobachtet man bemerkenswerterweise nicht während der Pheromonantwort.

Überraschenderweise wurde die Kinaseaktivität von Kpp2 für die Ausbildung der Infektionsstrukturen nicht benötigt, *kpp2K50R*-Mutanten zeigen ähnlich wie *kpp2*-Deletionsmutanten eine reduzierte Pathogenität. Entweder übt Kpp2 auch während der pathogenen Entwicklung Kinase-unabhängige Funktionen aus, oder auch in einer solchen Situation kann Kpp6 die enzymatische Funktion von Kpp2 zum Teil ersetzen. Interessanterweise sind entsprechende *kpp6K220R*-Mutanten ebenfalls pathogen (Brachmann, 2001). In diesem Zusammenhang ist bemerkenswert, dass in einem „Two-Hybrid“-Test Kpp2 Homodimere, und mit Kpp6 Heterodimere ausbilden konnte. Wenn solche Kpp2/Kpp6-Heterodimere auch *in vivo* vorliegen, ist vorstellbar, dass die Kinaseaktivität eines der Proteine ausreicht, um Zielproteine zu phosphorylieren. Aus Säugetierzellen ist bekannt, dass die Phosphorylierung aber nicht die Kinaseaktivität der MAPK Erk2 für eine Homodimerisierung Voraussetzung ist (Khokhlatchev *et al.*, 1998). Eine interessante Hypothese für die Mechanismen der Funktion



von Kpp2 und Kpp6 in *U. maydis* wäre daher, dass weder Kpp2AEF noch Kpp6AEF Homo- und Heterodimer ausbilden können, Kpp2K50R und Kpp6K220R dazu aber noch in der Lage sind. Damit würden drei verschiedene MAPK-Dimere den Infektionsprozess regulieren. Kpp2/Kpp2-Homodimere würden die *b*-Genexpression kontrollieren, die Ausbildung der Infektionsstrukturen unterläge redundanten Funktionen der Kpp2/Kpp2-Homodimere sowie der Kpp2/Kpp6-Heterodimere, die Penetration der Pflanze hingegen würde allein durch Kpp6/Kpp6-Homodimere reguliert werden. Dieses Modell wird durch zusätzliche Beobachtungen unterstützt. So konnte der Pathogenitätsdefekt der *kpp2*-Deletionsmutanten durch Überexpression eines aktiven *b*-Heterodimers zum größten Teil ausgeglichen werden, wohingegen eine solche Kompensation weder bei  $\Delta kpp6$ - noch bei  $\Delta kpp2-1\Delta kpp6$ -Mutanten beobachtet werden konnte (Brachmann *et al.*, 2003, J. Schirawski, persönliche Mitteilung). Die vorgestellte Hypothese kann darüber hinaus relativ leicht überprüft werden, da die Kombination aus *kpp2K50R* und *kpp6K220R* zum Verlust der Pathogenität führen sollte.

In dem hier vorgestellten Modell regulieren Kpp4 und Fuz7 während der frühen Infektionsphase beide MAP-Kinasen, Kpp2 und Kpp6. Obwohl bis jetzt noch nicht gezeigt worden ist, dass Kpp6 direkt von Fuz7 modifiziert wird, machen einzelne Beobachtungen diese Möglichkeit wahrscheinlich. Zum einen konnten im „Two-Hybrid“-Test direkte Interaktionen von Kpp4 mit Kpp6 und Kpp2 nachgewiesen werden, die vermutlich durch die putative D-Box in Kpp4 (Position 908 - 927) vermittelt wird. Kpp4 könnte also Kpp6, sowie Kpp2 zum Modul rekrutieren. Zum anderen gehören beide MAP-Kinasen zu der YERK1-Gruppe der MAPK-Familie und zeigen in ihren Primärsequenzen große Ähnlichkeiten zueinander (Brachmann *et al.*, 2003; siehe Abb. 15). Außerdem konnte bis jetzt im Genom von *U. maydis* neben Fuz7 keine weitere MAPKK identifiziert werden, die auf Grund ihrer Aminosäuresequenz der Gruppe der YERK1-spezifischen MAPK-Kinasen (Caffrey *et al.*, 1999) zu zuordnen wäre. Zusätzlich zeigen die Primärsequenzen von Kpp2 und Kpp6 besonders in den Bereichen wenige Unterschiede, denen in murinen MAP-Kinasen eine entscheidende Bedeutung für die Spezifität der MAPK-MAPKK Interaktionen zugeschrieben wird (Brunnet und Pouyssegúr, 1996; Enslin *et al.*, 2000; Robinson *et al.*, 2002; Tanoue *et al.*, 2000; Tanoue *et al.*, 2001; Wilsbacher *et al.*, 1999; Xu *et al.*, 2001).

Wenn die Annahme, dass Fuz7 nicht nur die MAPKK für Kpp2, sondern auch für Kpp6 ist, bestätigt werden kann, wird der Infektionsprozess in *U. maydis* durch ein MAPK-Modul reguliert, dass sich durch eine zeitlich versetzte Aktivierung von zwei MAPK auszeichnet.

### 3.3 Die Regulation der MAPKKK Kpp4

In Analogie zu anderen MAPKKK kann Kpp4 aus *U. maydis* in zwei Domänen unterteilt werden. Der C-terminale Teil beinhaltet die katalytische Funktion und der N-terminale Bereich repräsentiert eine regulatorische Domäne, welche die Aktivität von Kpp4 inhibiert. Eine solche Auto-Inhibition wurde schon für die verwandten MAPKKK Byr2 und Ste11p aus

*S. pombe* bzw. *S. cerevisiae* beschrieben und Aminosäuresubstitutionen, die in diesen MAPKKK zu konstitutiv-aktiven Kinasen führen (Stevenson *et al.*, 1992; Tu *et al.*, 1997), sind auf Kpp4 übertragbar. Kpp4-2, das einen Großteil seiner regulatorischen Domäne verloren hat, sowie die Variante Kpp4P681S, die eine Aminosäuresubstitution in der hochkonservierten „catalytic binding domain“ (CBD, Abb. 34A) besitzt, zeigen konstitutive Aktivität. Zusätzlich konnte eine Interaktion zwischen der regulatorischen und katalytischen Domäne von Kpp4 gezeigt werden. Aus *S. pombe* ist bekannt, dass die analoge P209S-Substitution in Byr2 die Interaktion zwischen beiden Domänen und damit die Auto-Inhibition der Kinase verhindert (Tu *et al.*, 1997). Damit ist es wahrscheinlich, dass die Aktivierung von Kpp4 durch die Aufhebung der Autoinhibition initiiert wird.

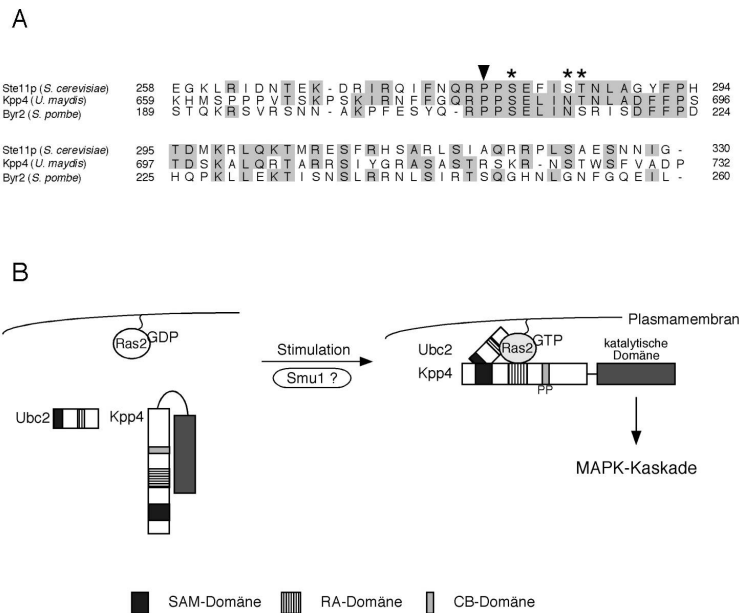
In *S. pombe* wird nach Pheromonstimulation die Auto-Inhibition von Byr2 durch die gemeinsame Aktion von Ste4, Ras1 und der Kinase Shk1 aufgehoben (Barr *et al.*, 1996; Masuda *et al.*, 1995; Tu *et al.*, 1997; Xu *et al.*, 1994). Dabei spielt die Interaktion von Ste4 und Ras1 mit den beiden Protein-Interaktionsdomänen SAM bzw. RA eine wichtige Rolle (Tu *et al.*, 1997). Für die Aktivierung von Ste11p in *S. cerevisiae* ist ebenfalls die Interaktion von Ste50p mit der SAM-Domäne wichtig, wohingegen Ras-Proteine nicht involviert sind (Wu, 1999). Entscheidend ist aber zusätzlich die direkte Modifizierung von Ste11p durch die Ste20p-Kinase (Drogen *et al.*, 2000). Ste20p phosphoryliert konservierte Serin/Threonin-Aminosäurereste in der CBD von Ste11p, die zum Teil auch in Byr2 und Kpp4 zu finden sind (Abb. 34A). Kürzlich ist in *U. maydis* die Ste20p-verwandte Kinase Smu1 isoliert worden und *smu1*-Deletionsmutanten zeigen Defekte in der Paarungskompetenz und der pathogenen Entwicklung (Smith *et al.*, 2003). Damit könnte Smu1 an der Aktivierung von Kpp4 beteiligt sein. Interessanterweise ist sowohl in *S. cerevisiae*, sowie in *S. pombe* die Aktivierung von Ste11p bzw. Byr2 mit einer Translokation der Kinasen an die Zytoplasmamembran gekoppelt. Diese Lokalisierung wird in *S. pombe* durch die direkte Interaktion mit Plasmamembrangebundenem Ras1 vermittelt, in *S. cerevisiae* geschieht dies hingegen durch die Interaktion mit Ste5p, das an die freien G $\beta\gamma$ -Untereinheiten Ste4p/Ste18p bindet (Bauman *et al.*, 1998; Choi *et al.*, 1994; Marcus *et al.*, 1994; Printen und Sprague, 1994). Eine analoge Translokation von Kpp4 an die Plasmamembran konnte in dieser Arbeit leider nicht gezeigt werden, da die Expression eines funktionellen GFP-Kpp4-Fusionsproteins zu keiner detektierbaren GFP-Fluoreszenz führte (nicht gezeigt).

Basierend auf bioinformatischen Analysen trägt Kpp4 von *U. maydis* vergleichbar mit Byr2 von *S. pombe* eine SAM- und eine RA-Domäne. In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass zumindest die RA-Domäne funktionell ist und eine funktionelle RA-Domäne für die volle Aktivierung der MAPK-Kaskade wichtig ist. In einem „Two-Hybrid“-Test interagierte die regulatorische Domäne von Kpp4 mit Ras1 und diese Interaktion konnte nicht mehr detektiert werden, wenn die RA-Domäne von Kpp4 durch die Aminosäuresubstitution K481E zerstört war. *U. maydis*-Stämme, die dieses *kpp4*<sup>K481E</sup>-Allel trugen zeigten eine Reduktion in der Paarungskompetenz, Konjugationshyphenbildung sowie Pathogenität. Daher lag die Vermu-

tung nahe, dass Ras1 an der Aktivierung von Kpp4 beteiligt sein könnte. Erstaunlicherweise konnte aber die Expression eines dominant-aktiven *ras1*-Allels (*ras1<sub>QL</sub>*) die MAPK-Kaskade nicht aktivieren. Daher ist anzunehmen, dass die beobachtete Interaktion zwischen Ras1 und Kpp4 für die Aktivierung der Kinase *in vivo* keine Relevanz hat. Vielmehr spricht einiges dafür, dass die Expression von *ras1<sub>QL</sub>* zu einer Aktivierung des cAMP-Signalwegs führt. Nach Expression von *ras1<sub>QL</sub>* teilten sich die Zellen weiterhin durch Knospung und zeigten eine stark induzierte *mfal*-Transkription sowie eine leicht erhöhte Expression des Gens *frb34*. All diese Beobachtungen werden auch bei Stämmen gemacht, die das dominant-aktive Allel der G $\alpha$ -Untereinheit *gpa3<sub>QL</sub>* tragen (Brachmann, 2001; Regenfelder *et al.*, 1997). Interessanterweise kann in der Adenylatzyklase Uac1 eine RA-Domäne (aa 970 - 1050) identifiziert werden. Es ist daher möglich, dass die Aktivität von Uac1 von der G $\alpha$ -Untereinheit Gpa3 und dem kleinen G-Protein Ras1 gemeinsam reguliert wird. Eine solche Regulation würde der der Adenylatzyklase Cyr1p in *S. cerevisiae* entsprechen (Nakafuku *et al.*, 1988; Toda *et al.*, 1985).

In *U. maydis* existiert aber noch ein zweites Ras-Gen, dem kürzlich eine Funktion während der Pheromonantwort und der pathogenen Entwicklung zugeschrieben werden konnte. Ein Verlust von *ras2* führt zu stark reduzierter Paarungskompetenz und Konjugationshyphenbildung, sowie zu Apathogenität (Lee und Kronstad, 2002). Darüber hinaus führte die Expression einer konstitutiv-aktiven Variante zu filamentösem Wachstum, dass *fuz7* und *kpp2* benötigte (Lee und Kronstad, 2002). Mit diesen Beobachtungen könnte Ras2 ein potentieller Regulator von Kpp4 sein, obwohl in dieser Arbeit keine Interaktion von Ras2 und Kpp4 nachgewiesen werden konnte. Von G-Proteinen ist bekannt, dass ihre Aktivierung und damit verbundene Bindung von GTP mit einer Konformationsänderung der so genannten „switch-regions“ I und II einhergeht (Sprang, 1997). Diese strukturelle Veränderung führt zu der Präsentation der Effektor-Bindestelle, die unter anderem an der Bindung von RA-Domänen beteiligt ist (Nassar *et al.*, 1995; Scheffzek *et al.*, 2001). Daher ist durchaus vorstellbar, dass Ras2 erst nach GTP-Bindung an die RA-Domäne von Kpp4 bindet und aus diesem Grund keine Interaktion zwischen Ras2 und Kpp4 im „Two-Hybrid“-Test detektiert wurde.

Kürzlich wurde ein weiterer Faktor, Ubc2, beschrieben, der ebenfalls an der Aktivierung von Kpp4 beteiligt sein könnte. *ubc2*-Deletionsmutanten haben einen Defekt in der Paarungskompetenz, zeigen keine Konjugationshyphenbildung und sind apathogen (Mayorga und Gold, 2001). Darüber hinaus zeigt Ubc2 Ähnlichkeiten zu Ste50p aus *S. cerevisiae* und Ste4 aus *S. pombe* und besitzt wie diese Proteine eine SAM-Domäne und wie Ste4 zusätzlich eine RA-Domäne (Mayorga und Gold, 2001). Für Ste50p sowie Ste5 wurde gezeigt, dass sie mit ihren Kinasen Ste11p bzw. über ihre SAM-Domänen interagieren (Bauman und Albright, 1998; Jansen *et al.*, 2001; Ramachander *et al.*, 2002; Tu *et al.*, 1997). Daher könnten in *U. maydis* Ubc2 und Kpp4 ebenfalls über ihre SAM-Domänen interagieren und diese Interaktion könnte für die Aktivierung der Kinase entscheidend sein.



**Abbildung 34: Modell der Aktivierung von Kpp4:** **A)** Darstellung der „catalytic binding domains“ (CBD) von Kpp4, Ste11p und Byr2. Identische Aminosäurereste sind grau hinterlegt. Der für die Bindung der katalytischen Domäne entscheidende Prolinrest ist mit einem Pfeil versehen, die in Ste11p von Ste20p phosphorylierten Serin/Threoninreste sind mit Sternen versehen. **B)** Modell der Aktivierung von Kpp4 in *U. maydis*. Abkürzungen: SAM, *sterile-alpha-motif*; RA, *Ras-association*; CB, *catalytic binding*; P, *Phosphatgruppe*. Beschreibung siehe Text.

Alle bisherigen Resultate weisen somit darauf hin, dass in *U. maydis* Kpp4 auf eine vergleichbare Art und Weise wie Byr2 in *S. pombe* reguliert wird. Die einkommenden Signale (Pheromon und putative Pflanzensignale während der pathogenen Entwicklung) könnten dabei auf Ras2 und die Ste20-Kinase Smu1 übertragen werden. Daraufhin würde GTP-gebundenes Ras2, Ubc2 sowie Kpp4 an die Plasmamembran rekrutieren (Abb. 34B). Dort führt die Interaktion mit Ras2 und Ubc2 zusammen mit der Phosphorylierung der CBD in Kpp4 durch Smu1 zur Aufhebung der Auto-Inhibition von Kpp4 und damit zur Aktivierung der MAPK-Kaskade (Abb. 34B).

### 3.4 Modellvorstellung der MAPK-Signalweiterleitung in *U. maydis*

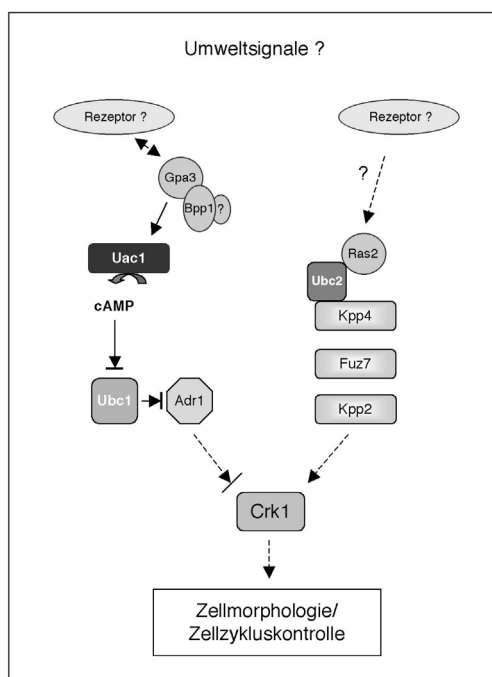
Im Folgenden werden die Ergebnisse dieser Arbeit im Zusammenhang mit bestehenden Kenntnissen über die Signalweiterleitung in *U. maydis* in drei Modelle zusammengefasst, die jeweils die Mechanismen der Signalübertragung während des vegetativen Wachstums, des Paarungs- und des Infektionsprozesses beinhalten.

Während des vegetativen Wachstums unterliegt die Zellmorphologie einer antagonistischen Kontrolle durch den cAMP-Signalweg und die Kpp4/Fuz7/Kpp2-MAPK-Kaskade. Der Einfluss der MAPK-Kaskade wird nur ersichtlich, wenn die cAMP-Kaskade inaktiv ist. So wird der filamentöse Phänotyp von Adenylatzyklase-Mutanten durch die zusätzliche Deletion

einer der Komponenten der MAPK-Kaskade aufgehoben. Auf diese Weise wurden unabhängig von dieser Arbeit Kpp4 als Ubc4, Fuz7 als Ubc5 und Kpp2 als Ubc3 identifiziert und in eine Kaskade eingeordnet (Andrews *et al.*, 2000; Mayorga und Gold, 1998; Mayorga und Gold, 1999).

Diese antagonistische Regulation der Zellmorphologie findet unterhalb von Kpp2 und Adr1 statt, da eine  $\Delta adr1 \Delta kpp2-1$ -Doppelmutante den gleichen Phänotyp wie eine  $\Delta uac1 \Delta kpp2-1$ -Mutante aufweist. Zusätzlich hat die Deletion von *kpp2* keinen Einfluss auf Phänotypen, die durch einen aktivierten cAMP-Signalweg hervorgerufen werden. Der cAMP-Signalweg und die MAPK-Kaskade übermitteln damit vermutlich unabhängig voneinander verschiedene Umweltsignale und integrieren diese in zelluläre Antworten. Über beide Signalwege könnten in *U. maydis* somit, vergleichbar mit den Aufgaben des cAMP-Signalwegs und der Kss1p-MAPK-Kaskade in *S. cerevisiae* (D'Souza und Heitman, 2001; Versele *et al.*, 2001), Umweltsignale wie Glukose und/oder zugängliche Stickstoffquellen wahrgenommen werden (Abb. 35).

Im Gegensatz zu der antagonistischen Wirkweise der beiden Signalwege in *U. maydis* unterliegt die pseudohyphale Entwicklung in *S. cerevisiae* einer synergistischen Kontrolle durch das Kss1p-MAPK-Modul sowie durch den cAMP-Signalweg (Pan *et al.*, 2000). Dies



**Abbildung 35: Modellvorstellung der Signalweiterleitung über den cAMP-Signalweg und der Kpp4/Fuz7/Kpp2-MAPK-Kaskade während des vegetativen Wachstums von *U. maydis*.** Mögliche Interaktionen und Signalweiterleitungswege sind mit gestrichelten Pfeilen und Fragezeichen versehen. Die komplexen zelluläre Antworten sind in Kästen beschrieben. Nähere Erklärungen, siehe Text.

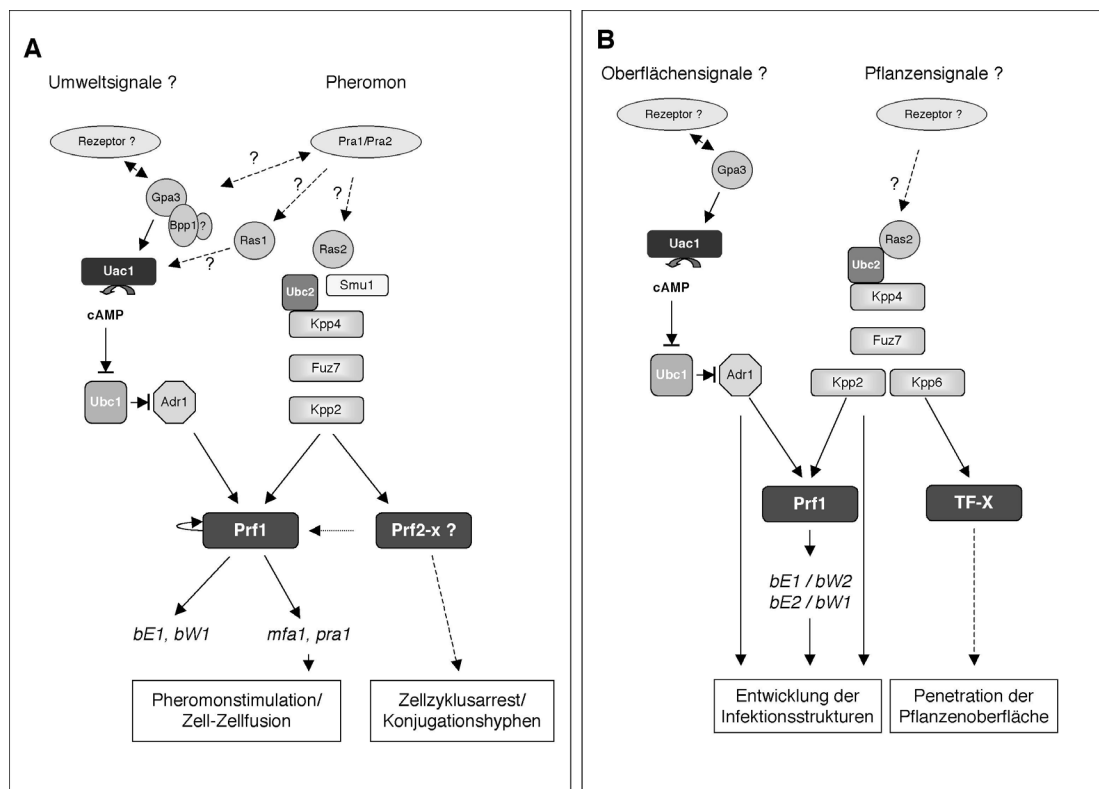
wird z.B. an der transkriptionellen Kontrolle des Gens *FLO11* deutlich (Rupp *et al.*, 1999). Auch in *U. maydis* konnten schon mehrere Gene identifiziert werden, die von der cAMP- und der MAPK-Kaskade gemeinsam, aber auf antagonistische Weise reguliert werden (Brachmann, 2001; Garrido und Pérez-Martin, 2003). So wird z.B. die *frb34*-Transkription durch die MAPK-Kaskade reprimiert, durch eine aktiven cAMP-Signalweg hingegen induziert. Entgegengesetzt ist die Expression von *crk1*, das für eine Serin/Threonin-Kinase kodiert, in *adr1*-Mutanten erhöht und in  $\Delta kpp2-1 \Delta adr1$ -Doppelmutanten unverändert (Garrido und Pérez-Martin, 2003). Crk1 könnte zusätzlich eine besondere Bedeutung zukommen, da seine Überexpression zu filamentösem Wachstum führt (Garrido und Pérez-Martin, 2003). Damit ist *crk1* vermutlich ein Bindeglied zwischen beiden Signalwegen. Interessanterweise ist Crk1 an der Regulation

des Zellzyklus beteiligt und wird für die Adaption an Stresssituationen benötigt. Unter solchen Bedingungen verkürzen *U. maydis*-Zellen ihre G<sub>2</sub>-Phase und wachsen filamentös, *crk1*-Mutanten können hingegen weder ihren Zellzyklus noch ihre Morphologie anpassen (Garrido und Pérez-Martin, 2003). So könnte die Anpassung der Zellmorphologie an äußere Einflüsse in direktem Zusammenhang mit der Zellzykluskontrolle stehen (Abb. 35).

Zur Einleitung des sexuellen Lebenszyklus ist die Expression von Prf1 entscheidend. Die Aktivität des *prf1*-Promotors wird dabei über PRE-Boxen von Prf1 selbst und über die UAS von anderen Transkriptionsfaktoren, z.B. Ncp1-3 bestimmt (Hartmann *et al.*, 1996; Hartmann *et al.*, 1999). An dieser Regulation sind vermutlich Adr1 und Kpp2 beteiligt, indem Adr1 die Grundaktivität von Prf1 bestimmt und Kpp2 über noch nicht definierte Faktoren die Expression von *prf1* reguliert. Die Bindung des Pheromons an einen passenden Rezeptor leitet die Pheromonantwort ein und das Pheromonsignal wird über das cAMP-Modul und die MAPK-Kaskade weitergeleitet (Abb. 36A). Dabei ist bis heute nicht klar, welche Signalkomponenten direkt an den Pheromonrezeptor gebunden sind. Es ist aber durchaus vorstellbar, dass Gpa3 mit Bpp1 und einer noch nicht identifizierten G $\gamma$ -Untereinheit und/oder Aktivatoren von Ras1 und Ras2 an Pra1/2 gekoppelt sind (Abb. 36A).

In *S. pombe* ist bekannt, dass Ras1 und die G $\alpha$ -Untereinheit Gpa1 gemeinsam an der Weiterleitung des Pheromonsignals auf die MAPK-Kaskade beteiligt sind (Xu *et al.*, 1994). In *S. cerevisiae* beobachtet man eine Ras2p-vermittelte Verbindung zwischen dem Pheromonrezeptor und der Adenylatzyklase Cyr1p (Arkinstall *et al.*, 1991; Papasavvas *et al.*, 1992), das Pheromonsignal wird aber über die G $\beta$ / $\gamma$ -Untereinheiten Ste4p/Ste18p auf die MAPK-Kaskade übertragen. Eine Aktivierung von Ras-Proteinen durch Sieben-Transmembran-Rezeptoren wird auch in Säugetierzellen beschrieben und das Verbindungsglied in diesem System ist ein so genannter „guanyl nucleotide exchange factor“ (GEF), der den GDP-GTP Austausch in kleinen G-Proteinen fördert (Mattingly und Macara, 1996; Pak *et al.*, 2002). So ist vorstellbar, dass in *U. maydis* stimulierte Pheromonrezeptoren das heterotrimere G-Protein Gpa3/Bpp1/? und über GEFs auch Ras1 und Ras2 aktivieren (Abb. 36A). Daraufhin wird die Adenylatzyklase Uac1 durch Gpa3[GTP] und Ras1[GTP] stimuliert, während Ras2[GTP] zusammen mit Ubc2 die MAPK-Kaskade aktiviert (Abb. 36A). Interessanterweise unterscheiden sich Ras1 und Ras2 in ihren Effektor-Bindestellen genau an den beiden Aminosäurepositionen (Ras1 D36E37; Ras2 E34T35), die in den beiden Ras-Proteinen Ras und Rap aus Mammalia für die Spezifität der Effektorbindung entscheidend sind (Nassar *et al.*, 1996).

Die Pheromonsignalweiterleitung über den cAMP-Signalweg und die Kpp4/Fuz7/Kpp2-MAPK-Kaskade führt dann zur Modifizierung von Prf1 und damit zur Pheromon-induzierten Transkription der *a*-Gene bzw. der *b*-Gene. Kpp2 muss zusätzlich noch weitere Faktoren (Prf2-x) aktivieren, die für den Zellzyklusarrest und die Ausbildung der Konjugationshyphen verantwortlich sind (Abb. 36A).



**Abbildung 36: Modellvorstellung der Signalweiterleitung in *U. maydis* während der Pheromonantwort (A) und der frühen Infektionsphase (B).** Mögliche Interaktionen und Signalweiterleitungswege sind mit gestrichelten Pfeilen und Fragezeichen versehen. Die komplexen zellulären Antworten sind in Kästen beschrieben. Nähere Erklärungen, siehe Text.

Nach der Zell-Zellfusion ist das Dikaryon in der Lage, auf der Pflanze filamentös zu wachsen, um eine geeignete Stelle zur Appressorienbildung und anschließender Penetration der Pflanzenoberfläche zu finden. Die Ausbildung der Appressorien regulieren Kpp4 und Fuz7 über die MAPK Kpp2, die Penetration aber über Kpp6 (Abb. 36B). Zusätzlich spielt vermutlich der cAMP-Signalweg bei diesen Differenzierungsschritten eine Rolle. *Δuac1*- sowie *Δgpa3*-Mutanten verursachen in infizierten Pflanzen keinerlei Symptome und dringen daher wahrscheinlich nicht in die Pflanze ein. In einer ganzen Reihe von verschiedenen phytopathogenen Pilzen unterliegt die Ausbildung der Infektionsstrukturen einer gemeinsamen Kontrolle von YERK1-MAP-Kinasen und cAMP-Signalkaskaden (Tucker und Talbot, 2001; Xu, 2000). Von den bekannten Beispielen ist die Funktion der YERK1-MAPK Pmk1 in *M. grisea* am besten verstanden. Pmk1 wird für die Entwicklung der Appressorien und zusätzlich für das invasive Wachstum innerhalb der Reispflanze benötigt (Xu und Hamer, 1996). In *U. maydis* hingegen scheinen diese Aufgaben zwischen Kpp2 und Kpp6 aufgeteilt zu sein. Kürzlich konnte in *M. grisea* der Transkriptionsfaktor Mst12 identifiziert werden, der für die Regulation der Pflanzenpenetration, aber nicht für die Entwicklung der Appressorien benötigt wird (Park *et al.*, 2002). Der Phänotyp der *MST12*-Mutanten in *M. grisea* ist also mit dem Phänotyp von *kpp6AEF*-Mutanten in *U. maydis* vergleichbar. Daher liegt die Vermutung nahe, dass in *U. maydis* die Penetration der Pflanzenoberfläche, sowie das invasive Wachstum

ebenfalls über einen Transkriptionsfaktor kontrolliert wird, der von Kpp6 aber nicht von Kpp2 reguliert wird (Abb. 36B).

Bisher konnte die Appressorienentwicklung von *U. maydis* nicht *in vitro* nachvollzogen werden. Daher ist über die Signale, die in *U. maydis* über die Signalkaskaden weitergeleitet werden und die Ausbildung der Appressorien stimulieren, bisher nichts bekannt. Im Gegensatz dazu konnten für *M. grisea* und verschiedene andere phytopathogene Pilze Reize identifiziert werden, die eine Ausbildung von Appressorien *in vitro* induzieren. Der Rostpilz *Uromyces appendiculatus* misst z.B. die physikalischen Eigenschaften der Pflanzenoberfläche, *M. grisea* und *Colletotrichum gloeosporioides* reagieren auf hydrophobe und harte Oberflächen, sowie chemische Signale wie Wachse (Gilbert *et al.*, 1996; Hoch *et al.*, 1987; Kim *et al.*, 2000b; Kolattukudy *et al.*, 1995; Lee und Dean, 1994; Podila *et al.*, 1993; Tucker und Talbot, 2001). Um die Signale zu identifizieren, die in *U. maydis* die Ausbildung der Appressorien induzieren, könnten die in dieser Arbeit hergestellten dominant-aktiven *kpp4*- und *fuz7*-Allele hilfreich sein. So wäre es möglich, dass die Expression dieser Allele eines der stimulierenden Signale ersetzen könnte und *U. maydis* in solchen Situationen z.B. in der Lage wäre auf hydrophoben Oberflächen Appressorien auszubilden.



## 4 Material und Methoden

### 4.1 Materialien und Bezugsquellen

#### 4.1.1 Medien, Lösungen, Enzyme und Kits

##### Chemikalien

Alle in dieser Arbeit verwendeten Chemikalien waren p. a. Qualität und wurden von den Firmen Sigma, Merck, Fluka, Riedel-de-Haën und Roth bezogen; Einzelheiten siehe (Brachmann, 2001).

##### Puffer und Lösungen

Standard-Puffer und Lösungen wurden nach (Ausubel *et al.*, 1987) und (Sambrook *et al.*, 1989) hergestellt, Einzelheiten dazu siehe (Brachmann, 2001). Spezielle Puffer und Lösungen sind unter den jeweiligen Methoden aufgeführt.

##### Medien

Für die Kultivierung von *E. coli* wurden dYT- und LB-Flüssigmedien und YT-Festmedium verwendet (Ausubel *et al.*, 1987; Sambrook *et al.*, 1989). Medienzusätze wurden, soweit nicht anders vermerkt, in folgenden Konzentrationen eingesetzt: Ampicillin (100 µg/ml), Chloramphenicol (34 µg/ml) und X-Gal (40 µg/ml).

Für die Kultivierung von *U. maydis* wurden folgende Medien verwendet, die wenn nicht anders angegeben 5 min bei 121 °C autoklaviert wurden:

YEPS<sub>L</sub>-Medium modifiziert nach (Tsukuda *et al.*, 1988):

10 g Yeast Extract  
10 g Pepton  
10 g Saccharose  
mit H<sub>2</sub>O auf 1 l aufgefüllt und autoklaviert

PD-Medium:

24 g Potato Dextrose Broth  
mit H<sub>2</sub>O auf 1 l aufgefüllt und autoklaviert

CM Vollmedium (Banuett und Herskowitz, 1989; Holliday, 1974):

1,5 g NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub>  
2,5 g Casamino Acids  
0,5 g DNA  
1 g Yeast Extract  
10 ml Vitamin-Lösung (siehe unten)  
62,5 ml Salz-Lösung (siehe unten)  
mit H<sub>2</sub>O auf 980 ml aufgefüllt  
mit NaOH auf pH 7,0 eingestellt und autoklaviert  
nach dem Autoklavieren:  
20 ml 50 % (w/v) Glucose-Lösung zugesetzt (f. c. 1 %)

NM Nitrat-Minimalmedium (Holliday, 1974):

3 g KNO<sub>3</sub>  
62,5 ml Salz-Lösung (siehe unten)  
mit H<sub>2</sub>O auf 980 ml aufgefüllt  
mit NaOH auf pH 7,0 eingestellt und autoklaviert  
nach dem Autoklavieren:  
20 ml 50 % (w/v) Glucose-Lösung zugesetzt (f. c. 1 %)

AM Ammonium-Minimalmedium (Holliday, 1974):

3 g (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>  
62,5 ml Salz-Lösung (siehe unten)  
mit H<sub>2</sub>O auf 980 ml aufgefüllt  
mit NaOH auf pH 7,0 eingestellt und autoklaviert  
nach dem Autoklavieren:  
20 ml 50 % (w/v) Glucose-Lösung zugesetzt (f. c. 1 %)

Salz-Lösung (Holliday, 1974):

16 g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>  
4 g Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>  
8 g KCl  
4 g MgSO<sub>4</sub> x 7 H<sub>2</sub>O  
1,32 g CaCl<sub>2</sub> x 2 H<sub>2</sub>O  
8 ml Spurenelement-Lösung (s. unten)  
mit H<sub>2</sub>O auf 1 l aufgefüllt und sterilfiltriert

Spurenelement-Lösung (Holliday, 1974):

60 mg H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub>  
140 mg MnCl<sub>2</sub> x 4 H<sub>2</sub>O  
400 mg ZnCl<sub>2</sub>  
40 mg NaMoO<sub>4</sub> x 2 H<sub>2</sub>O  
100 mg FeCl<sub>3</sub> x 6 H<sub>2</sub>O  
40 mg CuSO<sub>4</sub> x 5 H<sub>2</sub>O  
Mit H<sub>2</sub>O auf 1 l aufgefüllt und sterilfiltriert

Vitamin-Lösung (Holliday, 1974):

100 mg Thiamin

50 mg Riboflavin  
50 mg Pyridoxin  
200 mg Kalziumpantothenat  
500 mg p-Aminobenzoessäure  
200 mg Nikotinsäure  
200 mg Cholinchlorid  
1000 mg myo-Inositol  
Mit H<sub>2</sub>O auf 1 l aufgefüllt und sterilfiltriert

Regenerationsagar (Schulz *et al.*, 1990):

- a) Top-Agar:  
1,5 % (w/v) Bacto-Agar  
1 M Sorbitol  
in YEPS<sub>L</sub>-Medium  
b) Bottom-Agar:  
wie a), zusätzlich doppelt konzentriertes Antibiotikum.

CM-CC aktivkohlehaltiges Vollmedium

(Banuett und Herskowitz, 1989; Holliday, 1974):

6 g NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub>  
10 g Casamino Acids  
1 g DNA  
2 g Yeast Extract  
20 ml Vitamin-Lösung  
250 ml Salz-Lösung  
10 g Aktivkohle  
20 g Bacto-Agar  
mit H<sub>2</sub>O auf 960 ml aufgefüllt  
mit NaOH auf pH 7,0 eingestellt und autoklaviert  
nach dem Autoklavieren:  
40 ml 50 % (w/v) Glucose-Lösung zugesetzt (f. c. 2 %)

PD-CC aktivkohlehaltiges PD-Medium:

24 g Potato Dextrose Broth  
10 g Aktivkohle  
20 g Bacto-Agar  
mit H<sub>2</sub>O auf 1 l aufgefüllt und autoklaviert

Für Medien mit Arabinose als einziger Kohlenstoffquelle wurde nach dem Autoklavieren Arabinose statt Glucose in einer Endkonzentration von 1 % zugegeben. Für Festmedien wurde Bacto-Agar in einer Endkonzentration von 2 % zugegeben. Medienzusätze wurden, soweit nicht anders vermerkt, in folgenden Konzentrationen eingesetzt: Carboxin (2 µg/ml), Hygromycin (200 µg/ml), ClonNAT (150 µg/ml), Phleomycin (40 µg/ml). (Im Fall der Selektion mit Phleomycin auf Festmedien muss zusätzlich Tris-Cl pH 8,0 in einer Endkonzentration von 100 mM zugesetzt werden, da sonst das Antibiotikum wegen der Ansäuerung des Mediums durch *U. maydis* inaktiviert wird.)

Für die Kultivierung von *S. cerevisiae* wurden folgende Medien verwendet:

Drop-out Mix:

2 g Alanin  
2 g Arginin  
2 g Asparagin  
2 g Cystein  
2 g Glutamin  
2 g Glutaminsäure  
2 g Glycin  
2 g Inositol  
2 g Isoleucin  
2 g Lysin  
2 g Methionin  
0,2 g p-Aminobenzoessäure  
2 g Phenylalanin  
2 g Prolin  
2 g Serin  
2 g Tyrosin  
2 g Valin

Glucose-Minimalmedium (Kaiser *et al.*, 1994):

1,55 g Drop-out Mix  
5 g (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>  
20 g Glucose  
1,7 g Yeast Nitrogen Base  
mit H<sub>2</sub>O auf 200 ml aufgefüllt und sterilfiltrieren

Raffinose-Minimalmedium (Kaiser *et al.*, 1994):

1,55 g Drop-out Mix  
5 g (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>  
20 g Galaktose  
10 g Raffinose  
1,7 g Yeast Nitrogen Base  
Mit H<sub>2</sub>O auf 200 ml aufgefüllt und sterilfiltrieren

YEPD-Medium (Kaiser *et al.*, 1994):

10 g Yeast Extract  
20 g Pepton  
mit H<sub>2</sub>O auf 960 ml aufgefüllt  
nach dem Autoklavieren:  
40 ml 50 % (w/v) Glucose-Lösung zugesetzt (f. c. 2 %)  
Mit 800 ml 1,4 % BiTec-Agar auf 1000 ml aufgefüllt

Die Hefe-Minimalmedien enthalten kein Adenin (200 mg/l), Aspartat (100 mg/l), Histidin (20 mg/l), Leucin (100 mg/l), Threonin (200 mg/l), Tryptophan (20 mg/l) und Uracil (20 mg/l). Diese Aminosäuren wurden je nach Bedarf vor dem Sterilfiltrieren in der in Klammern stehenden Endkonzentration zugegeben. Für Glucose- und

Raffinoseminimal-Festmedium wurden 800 ml BiTec-Agar in einer Endkonzentration von 1,4 % zu 200 ml Glucose- bzw. Raffinoseminimalmedium zugegeben. Für YEPD-Festmedium wurde BiTec-Agar in einer Endkonzentration von 1,4 % zugegeben.

#### Enzyme

Restriktionsenzyme und T4-DNA Ligase wurden von NEB Biolabs bezogen, alle übrigen Enzyme von Roche mit den Ausnahmen Superscript Reverse Transkriptase (Gibco), *Taq*- (Laborpräparation), *TaqPlus® Precision*- und *Pfu*-DNA-Polymerase (Stratagene).

#### Verwendete Kits und sonstiges Material

Oligotex mRNA Midi Kit (Qiagen) zur Anreicherung von polyA<sup>+</sup> RNA, Advantage cDNA PCR Kit (Clontech) für die Synthese des cDNA-Zweitstrangs, QiaQuick PCR Purification Kit (Qiagen) zur Aufreinigung von PCR-Produkten, JETsorb Kit zur Elution von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen, JETquick Plasmid Maxi- und Miniprep Kit (Genomed) zur Präparation hochreiner Plasmid-DNA, JETquick General DNA Clean-Up Kit (Genomed) zur Aufreinigung von Plasmiden vor der Sequenzierung, TOPO-TA Cloning Kit (Invitrogen) zur Klonierung von PCR-Produkten, NEBlot Kit (NEB Biolabs) zur radioaktiven Markierung von DNA-Fragmenten, BigDye Kit (ABI) zur fluoreszenzmarkierten Sequenzierung, Microspin S-200 und S-300 Säulen (Amersham Pharmacia Biotech) zur Aufreinigung von radioaktiv markierten DNA-Sonden und Microspin G-25 Säulen (Amersham Pharmacia Biotech) zur Aufreinigung von radioaktiv markierten Oligonukleotiden. Weiteres verwendetes Material ist unter den jeweiligen Methoden beschrieben.

### 4.1.2 Oligonukleotide

Die Oligonukleotide wurden von den Firmen ARK, Metabion und MWG synthetisiert, die Nukleotidsequenz ist jeweils vom 5'- in Richtung 3'-Ende angegeben.

Folgende Oligonukleotide liegen alle im *kpp4*-Locus und wurden zur Sequenzierung, cDNA-Analysen, PCR und Mutagenese verwendet:

#### OPM2

TTG ACG TCG CGG TGC ATG

#### OPM4

CGA GAT CTT GAT ACC TCC

#### OPM11

CGC AAC TGC CAT GGG GAT C

#### OPM12

TCG GCC CAC GGATGC GTG

#### OPM13

GCT ATT CGA TCC AAG CCG AC

#### OPM19

GCA CTC GAT ACT GGC ACA CCC

#### OPM20

CGT GGA TTT TGA ACG CGT CGG

#### OPM21

AGG GCC GTG TCG AGG CAG

#### OPM22

GGC TGG GTT GTC GAC GAG G

#### OPM23

GCA CAC CAC AAC GTG TAA CG

#### OPM24

CAT CAC CCC ACA CGC AGT TC

#### OPM25

CAT AGA GGA GCG TGC GCT CGG

#### OPM31

CTC GTT GAA CAG GCC CGG C

#### OPM32

TGT GTG ATC CGA GCG CAC GC

#### OPM33

CAG GCA CAC GCT CCA AGC GC

#### OPM34

GGC AGT GGC GGC GCA TCC

#### OPM40

CAA AGC TCT CTC CGA CAA CG

#### OPM41

AAC CTT GCG TGC ATC CTC AC

#### OPM42

CAC CCA CCC TCG AGG ACC TC

#### OPM43

GAC GTT TAC GAT GCG CGT CG

#### OPM44

CTT CAG CCA GGG ACG GTT AC

#### OPM45

GCG TAG CCG GCC GAC TG

#### OPM46

CGA AGA GGC CAG ATG CGA C

#### OPM47

GGC GAG GCG TAT CCT GG C

#### OPM48

AAC ACC GAA GCC AAA CCG G

#### OPM49

AGG CAA AGT GAT CAA AGC GGA C

#### OPM50

GGG CTC TGT TTC AAG ATT GG

#### kpp4 (cDNA) rev2

TCG GTC TCG GAG CCA TCC

#### kpp4-768

GCG TTA ACC GCG GGT GTG AC

**kpp4-550**

CGA CGC TTC AAG TCG TCC

**kpp4+2239**

GGT GAC CAT CCA TGG AAC C

**kpp4+1376**

CGT TTA CGA TGC GCG TCG

**kpp4+974 (EcoRI)**

CCG GAA TTC CGT CGA TCG GTC CAT GAC C

**kpp4+964 (BamHI)**

CGC GGA TCC GAC GAA GAG ATG CCG CTG G

**kpp4+575**

AGC GGA GGT GGT CGC ATC

**kpp4+415**

GTG AGA TGG AGA CGA CGC

**kpp4+1368**

GGA CAA CAC GAC GCG CAT

**kpp4+1490 (BamHI)**

CGC GGA TCC GCC TCT TCG CTG AAC GC

**kpp4+1 (EcoRI)**

CCG GAA TTC AGT GCT GCA ACA CCT ACC

**kpp4+1186 (cDNA)**

AAG AGG CAA AGG G

**kpp4 POP I**

TGA TCC TCG CTG CCG CAC

**kpp4 POP II**

CGT CGA GGA TGA CCG AGC

**kpp4 -749 EcoRI**

GAA TTC GTG TGA CAT GCA CGA TGT GC

**kpp4+1 NotI**

GCG GCC GCA CGT GTT GGG AGC TGA GTG

**kpp4 Linker I**

TAT GAG TGC TGC AAC ACC TAC CAG C

**kpp4 Linker II**

CCG GGC TGG TAG GTG TTG CAG CAC TCA

**kpp4 PS**

AAG ATC CGC AAC TTC TTC GGC CAG CGA TCG CCC

TCA GAA CTC ATC

**kpp4 +2239**

GGT GAC CAT CCA TGG AAC C

**kpp4 RA III**

GCC TCT TCG CAG CGC TAT GC

**kpp4 RA IV**

CCA CAG GCA TGC GCT CAC C

**kpp4 RA V**

GCC GCT AGG CGG CTT GCC GAA TTC TTT GAG CAC

GCG CGC CAT GAC

Folgende Oligonukleotide liegen alle im *fuz7*-Locus und wurden für PCR und zur Mutagenese verwendet:

**fuz7EcoRI/BamHI-5'**

GAA TTC GGA TCC ATG CTT TCG TCC GGT GCG

**fuz7NdeI/XhoI-3'**

GTC GAC GCG GCC GCC CTT CAT CCC ATC GGC CC

**fuz7 DD**

ACA TGT AGG TAC TTG TAC CAA CAA AGT CGT CTG

CGA TAT CGT TGA TGA GC

**fuz7 +1 NdeI**

CAT ATG CTT TCG TCC GGT GCG

Folgende Oligonukleotide liegen alle im *kpp2*-Locus und wurden zur Sequenzierung, PCR und Mutagenese verwendet:

**kpp2 A**

CAT GCC ATG GCA CAT GCC CAC GGA CAG C

**kpp2 B**

ATT TGC GGC CGC AAG ATC AAC GCA TGA TCT C

**kpp2 C**

CCA TCG TGT GGC AAC GAA TTC GGC CAT GAA ACC C

**kpp2 D**

GGA GCT CTC CGA TGA CCA C

**K50RI**

CTC GTG TCG CCA TCC GGA AGA TCA CCC CAT TCG ATC AC

**K50RII**

TGA CGC GAT GCA TGT CG G

**K50RIII**

CAA AAG ACG CGT CGC TG C

**kpp2 POP I**

GAT GGT ATC GCG CAC CGG

**kpp2 POP II**

CTT GCG CCG ATT TCT GCC G

Folgende Oligonukleotide liegen alle im *ras1*-Locus und wurden zur PCR und Mutagenese verwendet:

**Ras1-5'-NdeI**

CAT ATG TCC AAA GCA CAA TTC TTG

**Ras1-Q65L**

GAC AGC TGT ATT CCT CGA GAC CAG CTG TAT CC

**Ras1QLXhoI**

CCG CTC GAG GAA TAC AGC TGT CAG AAG G

**Ras1-3'-NotI**

GCG GCC GCT TAG AGA ACG ATA CAT TTC TGG

Folgende Oligonukleotide wurden zur PCR-Überprüfung von *prf1<sup>con</sup>*-Stämmen eingesetzt:

**prf1 POPI**

ACG GAA CCA CTG CTC CGG

**prf1 POPII**

GGA TGC CTC TTG AGA GGC

weitere Oligonukleotide:

**OGW54**

ACA TAT CTA GCG GCG CCG

Liegt im Rückgrat der Plasmide der frei-replizierenden cDNA-Bank. Verwendet als äußeres

Oligonukleotid zur Amplifikation von 3'-cDNA-Enden.

#### OGW55

GTA CCG GTC TGT GCA CAC

Liegt im Rückgrat der Plasmide der frei-replizierenden cDNA-Bank. Verwendet als inneres Oligonukleotid zur Amplifikation von 3'-cDNA-Enden.

#### OGW56

CTG ATT TCC ACC CTC CCG

Liegt im Rückgrat der Plasmide der frei-replizierenden cDNA-Bank. Verwendet als äußeres Oligonukleotid zur Amplifikation von 5'-cDNA-Enden.

#### OGW57

TCT GAC CCT TCC GTT GCC

Liegt im Rückgrat der Plasmide der frei-replizierenden cDNA-Bank. Verwendet als inneres Oligonukleotid zur Amplifikation von 5'-cDNA-Enden.

#### OAN74

GAG CAG TTC ATG ATG GTA AG

Verwendet zur PCR-Analyse von Integrationsereignissen im *ip*-Locus.

#### OAN75

TTC GAG CTG GTT GCC TGC

Verwendet zur PCR-Analyse von Integrationsereignissen im *ip*-Locus.

#### OAN76

CTA TGC GGC ATC AGA GCA G

Verwendet zur PCR-Analyse von Integrationsereignissen im *ip*-Locus.

#### OAN77

TTC GCT CTA CCG ATG CCT T

Verwendet zur PCR-Analyse von Integrationsereignissen im *ip*-Locus.

#### OAN78

TCT CCA AGC CAC GGT TCC

Verwendet zur PCR-Analyse von Integrationsereignissen im *ip*-Locus.

#### REV24

TTC ACA CAG GAA ACA GCT ATG ACC

Hauptsächlich zur Sequenzierung verwendetes Oligonukleotid; liegt neben dem Polylinker von pBS(+)<sub>SK</sub>, pUC19, pSL1180, pNEB193 und pCR2.1-Topo.

#### UNI24

ACG ACG TTG TAA AAC GAC GGC CAG

Hauptsächlich zur Sequenzierung verwendetes Oligonukleotid; liegt neben dem Polylinker von pBS(+)<sub>SK</sub>, pUC19, pSL1180, pNEB193 und pCR2.1-Topo.

#### T7-24

GAA TTG TAA TAC GAC TCA CTA TAG

Zur Sequenzierung verwendetes Oligonukleotid; liegt neben dem Polylinker von pSP72.

#### SP6-24

CAT ACG ATT TAG GTG ACA CTA TAG

Zur Sequenzierung verwendetes Oligonukleotid; liegt neben dem Polylinker von pSP72.

#### MB69

TAC GTC GCC GTC CAG CTC G

Liegt im ORF von *sgfp*, wurde zur Sequenzierung verwendet.

### 4.1.3 Stämme

#### 4.1.3.1 *E. coli*-Stämme

Für sämtliche Klonierungen wurde der Stamm DH5 $\alpha$  (Hanahan, 1985) verwendet, bei dem es sich um ein Derivat des *E. coli*-Stammes K12 mit folgenden genetischen Markern handelt: F', *endA1*, *hsdR*, *hsdM*, *sup44*, *thi-1*, *gyrA1*, *gyrA96*, *relA1*, *recA1*, *lacZ*  $\Delta$ M15. Für die Klonierung von PCR-Amplifikaten in pCR2.1-Topo wurde der Stamm TOP10 (Invitrogen) benutzt, ebenfalls ein *E. coli* K12-Derivat mit dem Genotyp: F', *mcrA*,  $\Delta$ (*mrr-hsdRMS-mcrBC*),  $\Phi$ 80*lacZ* $\Delta$ M15,  $\Delta$ *lacX74*, *deoR*, *recA1*, *araD139*,  $\Delta$ (*ara-leu*)7697, *galU*, *galK*, *rpsL*(Str<sup>R</sup>), *endA1*, *nupG*.

Für die Überexpression der GST-Fusionsproteine wurde der Stamm, BL21::DE3[pLysS] (Novagen) verwendet. Dieser Stamm ist ein Derivat des Stammes *E. coli* B und trägt das pLysS (cam<sup>R</sup>) Plasmid und hat folgenden Genotyp auf: F', *ompT*, *hsdS*(r<sub>B</sub>- m<sub>B</sub>-), *dcm*<sup>+</sup>, Tet<sup>r</sup> *gal*(DE3), *endA*, *Hte*.

#### 4.1.3.2 *S. cerevisiae*-Stämme

Für das „Two-Hybrid“-System mit den Plasmiden pGAD424 und pGBT9 wurde der Hefe-Stamm Y153 verwendet (Bai und Elledge, 1997). Y153 weist folgenden Genotyp auf: *MATa*, *gal4*, *gal80*, *his3*, *trp1-901*, *ade2-101*, *ura3-52*, *leu2-3112*, *URA3::GALLacZ*. Für das „Two-Hybrid“-System mit den Plasmiden pLexA und pB42AD wurde der Hefe-Stamm EGY48[p8op-LacZ] verwendet, der mit dem Plasmid p8op-LacZ transformiert war (Estojak *et al.*, 1995; Clontech). EGY48 hat folgenden Genotyp auf: *MATa*, *his3*, *trp1*, *ura3*, *LexA6op::LEU2*.

#### 4.1.3.3 Maisvarietäten (*Zea mays* spec.)

Für alle Spritzinfektionen wurde die Maisvarietät Early Golden Bantam (Olds Seed Company, Madison, Wisconsin, USA) verwendet.

#### 4.1.3.4 *U. maydis*-Stämme

Die Stämme in Tabelle 11 dienten in dieser Arbeit als Ausgangs- und/oder Teststämme, die in Tabelle 12 aufgelisteten Stämme wurden in dieser Arbeit hergestellt. In allen Stämmen wurden homologe Rekombinationsereignisse durch Southern-Analyse bestätigt.

**Tabelle 11: Ausgangsstämme**

Stamm	Genotyp	Resistenz	Referenz
FB1	<i>a1 b1</i>	-	Banuett und Herskowitz, 1989
FB2	<i>a2 b2</i>	-	Banuett und Herskowitz, 1989
FB6a	<i>a2 b1</i>	-	Banuett und Herskowitz, 1989
FB6	<i>a1 b2</i>	-	Banuett und Herskowitz, 1989
CL13	<i>a1 bW2bE1</i>	-	Bölker <i>et al.</i> , 1995a
SG200	<i>a1:mfa2 bW2bE1</i>	Phleo <sup>R</sup>	Bölker <i>et al.</i> , 1995b
HA103	<i>a1 b<sup>con</sup></i>	Cbx <sup>R</sup>	Hartmann <i>et al.</i> , 1996
RK32	<i>a2 b3</i>	-	Schulz <i>et al.</i> , 1990
RK1786	<i>a1pral::Tn5H#3 b2</i>	Hyg <sup>R</sup>	Bölker <i>et al.</i> , 1992
FB2Δgpa3	<i>a2 b2 Δgpa3</i>	Hyg <sup>R</sup>	Regenfelder <i>et al.</i> , 1997
FB1gpa3 <sub>QL</sub>	<i>a1 b1 gpa3<sub>Q206L</sub></i>	-	Regenfelder <i>et al.</i> , 1997
FB2Δbpp1-2	<i>a2 b2 Δbpp1-2</i>	Nat <sup>R</sup>	Müller <i>et al.</i> , 2003b
FB1Δubc1	<i>a1 b1 Δubc1</i>	Nat <sup>R</sup>	Hartmann <i>et al.</i> , 1999
HA271	<i>a1 b1 prf1<sup>con</sup></i>	Cbx <sup>R</sup>	Hartmann <i>et al.</i> , 1999
HA266	<i>a2 b2 prf1<sup>con</sup></i>	Cbx <sup>R</sup>	Hartmann <i>et al.</i> , 1999
FB1Δkpp2-1	<i>a1 b1 Δkpp2-1</i>	Nat <sup>R</sup>	Müller <i>et al.</i> , 1999
FB2Δkpp2-1	<i>a2 b2 Δkpp2-1</i>	Nat <sup>R</sup>	Müller <i>et al.</i> , 1999
SG200Δkpp2-1	<i>a1:mfa2 bW2bE1 Δkpp2-1</i>	Nat <sup>R</sup> ,Phleo <sup>R</sup>	Müller <i>et al.</i> , 1999
FB1Δprf1	<i>a1 b1 Δprf1</i>	Nat <sup>R</sup>	Müller <i>et al.</i> , 1999
FB2Δprf1	<i>a2 b2 Δprf1</i>	Nat <sup>R</sup>	Müller <i>et al.</i> , 1999
FB1prf1-E1	<i>a1 b1 prf1-E1</i>	Hyg <sup>R</sup>	Müller <i>et al.</i> , 1999
FB1prf1-M1	<i>a1 b1 prf1-M1</i>	Hyg <sup>R</sup>	Müller <i>et al.</i> , 1999
FB1prf1-P1	<i>a1 b1 prf1-P1</i>	Hyg <sup>R</sup>	M. Feldbrügge, p. Mitteilung
FB1prf1 <sup>con</sup>	<i>a1 b1 prf1<sup>con</sup></i>	Hyg <sup>R</sup>	M. Feldbrügge, p. Mitteilung
FB1Δkpp6	<i>a1 b1 Δkpp6</i>	Hyg <sup>R</sup>	Brachmann, 2001
SG200Δkpp6	<i>a1:mfa2 bW2bE1 Δkpp6</i>	Hyg <sup>R</sup> ,Phleo <sup>R</sup>	Brachmann, 2001
FB1Δfuz7	<i>a1 b1 Δfuz7</i>	Nat <sup>R</sup>	G. Weinzierl, p. Mitteilung
FB2Δfuz7	<i>a2 b2 Δfuz7</i>	Nat <sup>R</sup>	G. Weinzierl, p. Mitteilung
SG200Δfuz7	<i>a1:mfa2 bW2bE1 Δfuz7</i>	Nat <sup>R</sup> ,Phleo <sup>R</sup>	G. Weinzierl, p. Mitteilung

Tabelle 12: In dieser Arbeit hergestellte Stämme

Stamm	Genotyp	Resistenz	Ausgangsstamm	Transformation/Southern
FB1Δkpp4	<i>a1 b1 Δkpp4</i>	Hyg <sup>R</sup>	FB1	<b>Plasmid</b> <sup>1</sup> : pKpp4-1 verdaut mit <i>DraI</i> <b>Trans. DNA</b> <sup>2</sup> : <i>BamHI</i> <b>Sonde</b> <sup>3</sup> : 7,4 kb <i>BamHI/BamHI</i> - Fragment aus pKpp4 <b>WT</b> <sup>4</sup> : 7,4 kb <b>HR</b> <sup>5</sup> : 5,9 kb siehe FB1Δkpp4 siehe FB1Δkpp4 siehe FB1Δkpp4 <b>Plasmid</b> <sup>1</sup> : pΔkpp2-1 verdaut mit <i>BamHI</i> <b>Trans. DNA</b> <sup>2</sup> : <i>SaII</i> <b>Sonde</b> <sup>3</sup> : 2,8 kb <i>HindIII/SaII</i> - Fragment aus pkpp2H <b>WT</b> <sup>4</sup> : 6,3 kb <b>HR</b> <sup>5</sup> : 5,7 und 1,5 kb <b>Plasmid</b> <sup>1</sup> : pRF <sup>com</sup> verdaut mit <i>DraI</i> <b>Trans. DNA</b> <sup>2</sup> : <i>PstI</i> <b>Sonde</b> <sup>3</sup> : 3,2 kb <i>BamHI/BamHI</i> - Fragment aus pRF-4.7H <b>WT</b> <sup>4</sup> : 8,5 kb <b>HR</b> <sup>5</sup> : 7,2 und 3,5 kb siehe FB1prf1 <sup>com</sup> Δkpp2-1 siehe HA103Δkpp2-1 <b>Plasmid</b> <sup>1</sup> : pubc1-1 verdaut mit <i>BamHI</i> <b>Trans. DNA</b> <sup>2</sup> : <i>BamHI</i> <b>Sonde</b> <sup>3</sup> : 3,6 kb <i>EcoRI/EcoRI</i> - Fragment aus pTZ19R-ubc1 <b>WT</b> <sup>4</sup> : 9,8 kb <b>HR</b> <sup>5</sup> : 13,6 kb <b>PCR</b> <sup>6</sup> : 3,8 kb PCR-Produkt adr1-894/adr1+2262 auf pCRadr1k.o. <b>Trans. DNA</b> <sup>2</sup> : <i>SphI/NorI</i> <b>Sonde</b> <sup>3</sup> : PCR-Produkt <b>WT</b> <sup>4</sup> : 3,5 kb <b>HR</b> <sup>5</sup> : 2,7 und 1,5 kb siehe FB2Δadr1
FB2Δkpp4	<i>a2 b2 Δkpp4</i>	Hyg <sup>R</sup>	FB2	
SG200Δkpp4	<i>a1:mfa2 bW2bE1 Δkpp4</i>	Hyg <sup>R</sup> , Phleo <sup>R</sup>	SG200	
HA103Δkpp4	<i>a1 b<sup>com</sup></i>	Hyg <sup>R</sup> , Cbx <sup>R</sup>	HA103	
HA103Δkpp2-1	<i>a1 b<sup>com</sup></i>	Nat <sup>R</sup> , Cbx <sup>R</sup>	HA103	
FB1prf1 <sup>com</sup> Δkpp2-1	<i>a1 b1 prf1<sup>com</sup> Δkpp2-1</i>	Nat <sup>R</sup> , Cbx <sup>R</sup>	FB1Δkpp2-1	
FB2prf1 <sup>com</sup> Δkpp2-1	<i>a2 b2 prf1<sup>com</sup> Δkpp2-1</i>	Nat <sup>R</sup> , Cbx <sup>R</sup>	FB2Δkpp2-1	
FB2gpa3 <sub>OL</sub> Δkpp2-1	<i>a2 b2 gpa3<sub>OL</sub> Δkpp2-1</i>	Nat <sup>R</sup>	FB2gpa3 <sub>OL</sub>	
FB1Δkpp2-1Δubc1	<i>a1 b1 Δubc1 Δkpp2-1</i>	Nat <sup>R</sup> , Hyg <sup>R</sup>	FB1Δkpp2-1	
FB2Δadr1	<i>a2 b2 Δadr1</i>	Hyg <sup>R</sup>	FB2	
FB2Δkpp2-1Δadr1	<i>a2 b2 Δadr1 Δkpp2-1</i>	Nat <sup>R</sup> , Hyg <sup>R</sup>	FB2Δkpp2-1	

Tabelle 12: Fortsetzung

Stamm	Genotyp	Resistenz	Ausgangsstamm	Transformation/Southern
SG200Δkpp6Δkpp2-1	<i>a1 :mja2 bW2bE1 Δkpp6 Δkpp2-1</i>	Nat <sup>R</sup> , Hyg <sup>R</sup> , Phleo <sup>R</sup>	SG200Δkpp6	<b>Plasmid</b> <sup>1</sup> : pΔkpp2-1 verdaut mit <i>Bam</i> HI <b>Trans. DNA</b> <sup>2</sup> : <i>Eco</i> RI/ <i>Not</i> I <b>Sonde</b> <sup>3</sup> : 4,3 kb <i>Hind</i> III/ <i>Hind</i> III- Fragment aus pkpp2H <b>WT</b> <sup>4</sup> : 8,4 und 2,2 kb <b>HR</b> <sup>5</sup> : 8,4 / 0,9 / 0,8 kb <b>Plasmid</b> <sup>1</sup> : pΔfuz7 verdaut mit <i>Dra</i> I <b>Trans. DNA</b> <sup>2</sup> : <i>Sph</i> I/ <i>Not</i> I- Fragment aus pkpp2H <b>WT</b> <sup>4</sup> : 3,2 kb <b>HR</b> <sup>5</sup> : 1,9 und 0,45 kb <b>Plasmid</b> <sup>1</sup> : pkpp4WT-tef-Hyg(-) verdaut mit <i>Dra</i> I <b>Trans. DNA</b> <sup>2</sup> : <i>Bam</i> HI/ <i>Eco</i> RI <b>Sonde</b> <sup>3</sup> : 7,4 kb <i>Bam</i> HI/ <i>Bam</i> HI- Fragment aus pKpp4 <b>WT</b> <sup>4</sup> : 7,4 kb <b>HR</b> <sup>5</sup> : 5,4 und 3,8 kb siehe FB1kpp4WT <b>Plasmid</b> <sup>1</sup> : pkpp4RA-tef-Hyg(-) verdaut mit <i>Dra</i> I <b>Trans. DNA</b> <sup>2</sup> : <i>Bam</i> HI/ <i>Eco</i> RI/ <i>Nde</i> I <b>Sonde</b> <sup>3</sup> : 7,4 kb <i>Bam</i> HI/ <i>Bam</i> HI- Fragment aus pKpp4 <b>WT</b> <sup>4</sup> : 7,4 kb <b>HR</b> <sup>5</sup> : 3,9/3,6/3,8 kb siehe FB1kpp4RA <b>Plasmid</b> <sup>1</sup> : p123crg1kpp4-2 verdaut mit <i>Age</i> I <b>Trans. DNA</b> <sup>2</sup> : <i>Bam</i> HI <b>Sonde</b> <sup>3</sup> : 4,9 kb <i>Not</i> I/ <i>Not</i> I- Fragment aus pNEB-Cbx(+) <b>WT</b> <sup>4</sup> : 4,9 kb <b>HR</b> <sup>5</sup> : 11,5 und 3,8 kb siehe FB1P <sub>crg1</sub> :kpp4-2
HA103Δfuz7	<i>a1 b<sup>con</sup> Δfuz7</i>	Nat <sup>R</sup> , Cbx <sup>R</sup>	HA103	
FB1kpp4WT	<i>a1 b1 P<sub>efl</sub>:kpp4WT</i>	Hyg <sup>R</sup>	FB1	
FB2kpp4WT FB1kpp4RA	<i>a2 b2 P<sub>efl</sub>:kpp4WT</i> <i>a1 b1 P<sub>efl</sub>:kpp4<sup>K481E</sup></i>	Hyg <sup>R</sup> Cbx <sup>R</sup>	FB2 FB1	
FB2kpp4RA FB1P <sub>crg1</sub> :kpp4-2	<i>a2 b2 P<sub>efl</sub>:kpp4<sup>K481E</sup></i> <i>a1 b1 ip'[P<sub>crg1</sub>:kpp4-2]ip<sup>s</sup></i>	Hyg <sup>R</sup> Cbx <sup>R</sup>	FB2 FB1	
FB1Δfuz7P <sub>crg1</sub> :kpp4-2	<i>a1 b1 Δfuz7 ip'[P<sub>crg1</sub>:kpp4-2]ip<sup>s</sup></i>	Nat <sup>R</sup> , Cbx <sup>R</sup>	FB1Δfuz7	



Tabelle 12: Fortsetzung

Stamm	Genotyp	Resistenz	Ausgangsstamm	Transformation/Southern
FB1Δkpp2-1P <sub>crgi</sub> :kpp4-2	<i>a1 b1 Δkpp2-1 ip' [P<sub>crgi</sub>:kpp4-2] ip<sup>s</sup></i>	Nat <sup>R</sup> , Cbx <sup>R</sup>	FB1Δkpp2-1	siehe FB1P <sub>crgi</sub> :kpp4-2
FB1Δprf1P <sub>crgi</sub> :kpp4-2	<i>a1 b1 Δprf1 ip' [P<sub>crgi</sub>:kpp4-2] ip<sup>s</sup></i>	Nat <sup>R</sup> , Cbx <sup>R</sup>	FB1Δprf1	siehe FB1P <sub>crgi</sub> :kpp4-2
FB1Δkpp6P <sub>crgi</sub> :kpp4-2	<i>a1 b1 Δkpp6 ip' [P<sub>crgi</sub>:kpp4-2] ip<sup>s</sup></i>	Hyg <sup>R</sup> , Cbx <sup>R</sup>	FB1Δkpp6	siehe FB1P <sub>crgi</sub> :kpp4-2
FB1P <sub>crgi</sub> :fuz7DD	<i>a1 b1 ip' [P<sub>crgi</sub>:fuz7DD] ip<sup>s</sup></i>	Cbx <sup>R</sup>	FB1	<b>Plasmid</b> <sup>1</sup> : p123crg1fuz7DD verdaut mit <i>AgeI</i> <b>Trans. DNA</b> <sup>2</sup> : <i>BamHI</i> / <i>NotI</i> - <b>Sonde</b> <sup>3</sup> : 4,9 kb <i>NotI</i> / <i>NotI</i> - Fragment aus pNEB-Cbx(+) <b>WT</b> <sup>4</sup> : 4,9 kb <b>HR</b> <sup>5</sup> : 8,9 und 5,6 kb siehe FB1P <sub>crgi</sub> :fuz7DD siehe FB1P <sub>crgi</sub> :fuz7DD siehe FB1P <sub>crgi</sub> :fuz7DD <b>Plasmid</b> <sup>1</sup> : p123crg1kpp4PS verdaut mit <i>SspI</i> <b>Trans. DNA</b> <sup>2</sup> : <i>BamHI</i> <b>Sonde</b> <sup>3</sup> : 4,9 kb <i>NotI</i> / <i>NotI</i> - Fragment aus pNEB-Cbx(+) <b>WT</b> <sup>4</sup> : 4,9 kb <b>HR</b> <sup>5</sup> : 5,5 und 3,8 kb siehe FB1P <sub>crgi</sub> :kpp4PS <b>Plasmid</b> <sup>1</sup> : p123pra2 verdaut mit <i>BsrGI</i> <b>Trans. DNA</b> <sup>2</sup> : <i>BamHI</i> <b>Sonde</b> <sup>3</sup> : 4,9 kb <i>NotI</i> / <i>NotI</i> - Fragment aus pNEB-Cbx(+) <b>WT</b> <sup>4</sup> : 4,9 kb <b>HR</b> <sup>5</sup> : 6,8 und 4,7 kb siehe FB2pra2 siehe FB2pra2 siehe FB2pra2 siehe FB2pra2 siehe FB1P <sub>crgi</sub> :fuz7DD siehe FB1P <sub>crgi</sub> :fuz7DD siehe FB1P <sub>crgi</sub> :fuz7DD
FB1Δkpp4P <sub>crgi</sub> :fuz7DD	<i>a1 b1 Δkpp4 ip' [P<sub>crgi</sub>:fuz7DD] ip<sup>s</sup></i>	Hyg <sup>R</sup> , Cbx <sup>R</sup>	FB1Δkpp4	
FB1Δkpp2-1P <sub>crgi</sub> :fuz7DD	<i>a1 b1 Δkpp2-1 ip' [P<sub>crgi</sub>:fuz7DD] ip<sup>s</sup></i>	Nat <sup>R</sup> , Cbx <sup>R</sup>	FB1Δkpp2-1	
FB1Δprf11P <sub>crgi</sub> :fuz7DD	<i>a1 b1 Δprf1 ip' [P<sub>crgi</sub>:fuz7DD] ip<sup>s</sup></i>	Nat <sup>R</sup> , Cbx <sup>R</sup>	FB1Δprf1	
FB1P <sub>crgi</sub> :kpp4PS	<i>a1 b1 ip' [P<sub>crgi</sub>:kpp4PS] ip<sup>s</sup></i>	Cbx <sup>R</sup>	FB1	
FB1Δkpp2-1P <sub>crgi</sub> :kpp4PS	<i>a1 b1 Δkpp2-1 ip' [P<sub>crgi</sub>:kpp4PS] ip<sup>s</sup></i>	Nat <sup>R</sup> , Cbx <sup>R</sup>	FB1Δkpp2-1	
FB2pra2	<i>a2 b2 ip' [P<sub>oei</sub>:pra2] ip<sup>s</sup></i>	Cbx <sup>R</sup>	FB2	
FB2pra2Δkpp4	<i>a2 b2 Δkpp4 ip' [P<sub>oei</sub>:pra2] ip<sup>s</sup></i>	Hyg <sup>R</sup> , Cbx <sup>R</sup>	FB2Δkpp4	
FB2pra2Δfuz7	<i>a2 b2 Δfuz7 ip' [P<sub>oei</sub>:pra2] ip<sup>s</sup></i>	Nat <sup>R</sup> , Cbx <sup>R</sup>	FB2Δfuz7	
FB2pra2Δkpp2-1	<i>a2 b2 Δkpp2-1 ip' [P<sub>oei</sub>:pra2] ip<sup>s</sup></i>	Nat <sup>R</sup> , Cbx <sup>R</sup>	FB2Δkpp2-1	
FB2pra2Δprf1	<i>a2 b2 Δprf1 ip' [P<sub>oei</sub>:pra2] ip<sup>s</sup></i>	Nat <sup>R</sup> , Cbx <sup>R</sup>	FB2Δprf1	
FB1prf-E1P <sub>crgi</sub> :fuz7DD	<i>a1 b1 prf1-E1 ip' [P<sub>crgi</sub>:fuz7DD] ip<sup>s</sup></i>	Hyg <sup>R</sup> , Cbx <sup>R</sup>	FB1prf1E-1	
FB1prf-M11P <sub>crgi</sub> :fuz7DD	<i>a1 b1 prf1-M1 ip' [P<sub>crgi</sub>:fuz7DD] ip<sup>s</sup></i>	Hyg <sup>R</sup> , Cbx <sup>R</sup>	FB1prf1M-1	
FB1prf-P1P <sub>crgi</sub> :fuz7DD	<i>a1 b1 prf1-P1 ip' [P<sub>crgi</sub>:fuz7DD] ip<sup>s</sup></i>	Hyg <sup>R</sup> , Cbx <sup>R</sup>	FB1prf1P-1	

Tabelle 12: Fortsetzung

Stamm	Genotyp	Resistenz	Ausgangsstamm	Transformation/Southern
FB1prf1 <sup>com</sup> P <sub>cgl</sub> :kpp4-2	<i>a1 b1 prf1<sup>com</sup> ip'[P<sub>cgl</sub>:kpp4-2]ip<sup>s</sup></i>	Hyg <sup>R</sup> , Cbx <sup>R</sup>	FB1P <sub>cgl</sub> :kpp4-2	<b>Plasmid</b> <sup>1</sup> : MF29 verdaut mit <i>DraI</i> <b>Trans. DNA</b> <sup>2</sup> : <i>PstI</i> <b>Sonde</b> <sup>3</sup> : 3,2 kb <i>BamHI/BamHI</i> - Fragment aus pRF-4.7H <b>WT</b> <sup>4</sup> : 8,5 kb <b>HR</b> <sup>5</sup> : 6,0 und 3,8 kb siehe FB1prf1 <sup>com</sup> P <sub>cgl</sub> :kpp4-2 siehe FB1prf1 <sup>com</sup> P <sub>cgl</sub> :kpp4-2 <b>Plasmid</b> <sup>1</sup> : pkpp2-GFP-hom verdaut mit <i>DraI</i> <b>Trans. DNA</b> <sup>2</sup> : <i>HindIII/EcoRI</i> <b>Sonde</b> <sup>3</sup> : 2,8 kb <i>HindIII/SalI</i> - Fragment aus pkpp2H <b>WT</b> <sup>4</sup> : 2,2 und 2,2 kb <b>HR</b> <sup>5</sup> : 4,5 und 2,5 kb <b>Plasmid</b> <sup>1</sup> : pkpp2WT-hom verdaut mit <i>DraI</i> <b>Trans. DNA</b> <sup>2</sup> : <i>HindIII-NotI</i> <b>Sonde</b> <sup>3</sup> : 4,3 kb <i>HindIII/HindIII</i> - Fragment aus pkpp2H <b>WT</b> <sup>4</sup> : 4,3 kb <b>HR</b> <sup>5</sup> : 3,7 und 2,1 kb siehe FB1kpp2WT siehe FB1kpp2WT <b>Plasmid</b> <sup>1</sup> : pkpp2K50R-hom verdaut mit <i>DraI</i> <b>Trans. DNA</b> <sup>2</sup> : <i>EcoRI/BspEI</i> <b>Sonde</b> <sup>3</sup> : 4,3 kb <i>HindIII/HindIII</i> - Fragment aus pkpp2H <b>WT</b> <sup>4</sup> : 8,4 und 2,2 kb <b>HR</b> <sup>5</sup> : 8,3 / 2,5 / 1,2 kb siehe FB1kpp2K50R siehe FB1kpp2K50R
FB1prf1 <sup>com</sup> Δkpp2-1P <sub>cgl</sub> :kpp4-2 FB1prf1 <sup>com</sup> P <sub>cgl</sub> :fuz7DD FB2kpp2-GFP	<i>a1 b1 prf1<sup>com</sup> Δkpp2-1 ip'[P<sub>cgl</sub>:kpp4-2]ip<sup>s</sup></i> <i>a1 b1 prf1<sup>com</sup> ip'[P<sub>cgl</sub>:fuz7DD]ip<sup>s</sup></i> <i>a2 b2 kpp2-GFP</i>	Hyg <sup>R</sup> , Nat <sup>R</sup> , Cbx <sup>R</sup> Hyg <sup>R</sup> , Cbx <sup>R</sup> Nat <sup>R</sup>	FB1Δkpp2-1P <sub>cgl</sub> :kpp4-2 FB1P <sub>cgl</sub> :fuz7DD FB2	
FB1kpp2WT	<i>a1 b1 kpp2WT</i>	Nat <sup>R</sup>	FB1	
FB2kpp2WT SG200kpp2WT FB1kpp2K50R	<i>a2 b2 kpp2WT</i> <i>a1:mfa2 bW2bE1 kpp2WT</i> <i>a1 b1 kpp2<sup>K50R</sup></i>	Nat <sup>R</sup> Nat <sup>R</sup> Nat <sup>R</sup>	FB2 SG200 FB1	
FB2kpp2K50R SG200kpp2K50R	<i>a2 b2 kpp2<sup>K50R</sup></i> <i>a1:mfa2 bW2bE1 kpp2<sup>K50R</sup></i>	Nat <sup>R</sup> Nat <sup>R</sup>	FB2 SG200	

Tabelle 12: Fortsetzung

Stamm	Genotyp	Resistenz	Ausgangsstamm	Transformation/Southern
FB1kpp2AEF	<i>a1 b1 kpp2<sup>T182AY184F</sup></i>	Nat <sup>R</sup>	FB1	<b>Plasmid</b> <sup>1</sup> : pkpp2AEF-hom verdaut mit <i>DraI</i> <b>Trans. DNA</b> <sup>2</sup> : <i>EcoRI/NotI</i> <b>Sonde</b> <sup>3</sup> : 4,3 kb <i>HindIII/HindIII</i> - Fragment aus pkpp2H <b>WT</b> <sup>4</sup> : 8,4 und 2,2 kb <b>HR</b> <sup>5</sup> : 8,6 und 1,5 kb siehe FB1kpp2AEF siehe FB1kpp2AEF <b>Plasmid</b> <sup>1</sup> : pkpp2-GFP-hom verdaut mit <i>DraI</i> <b>Trans. DNA</b> <sup>2</sup> : <i>EcoRI/BspEI</i> <b>Sonde</b> <sup>3</sup> : 4,3 kb <i>HindIII/HindIII</i> - Fragment aus pkpp2H <b>WT</b> <sup>4</sup> : 8,4 und 2,2 kb <b>HR</b> <sup>5</sup> : 8,6 und 4,5 kb <b>Plasmid</b> <sup>1</sup> : pkpp2K50R-GFP-hom verdaut mit <i>DraI</i> <b>Trans. DNA</b> <sup>2</sup> : <i>EcoRI/BspEI</i> <b>Sonde</b> <sup>3</sup> : 4,3 kb <i>HindIII/HindIII</i> - Fragment aus pkpp2H <b>WT</b> <sup>4</sup> : 8,4 und 2,2 kb <b>HR</b> <sup>5</sup> : 8,3 / 2,8 / 1,3 kb <b>Plasmid</b> <sup>1</sup> : pkpp2AEF-GFP-hom verdaut mit <i>DraI</i> <b>Trans. DNA</b> <sup>2</sup> : <i>EcoRI/BspEI</i> <b>Sonde</b> <sup>3</sup> : 4,3 kb <i>HindIII/HindIII</i> - Fragment aus pkpp2H <b>WT</b> <sup>4</sup> : 8,4 und 2,2 kb <b>HR</b> <sup>5</sup> : 8,6 / 2,8 / 1,7 kb siehe FB1P <sub>erg1</sub> :fuz7DD siehe FB1P <sub>erg1</sub> :fuz7DD siehe FB1P <sub>erg1</sub> :fuz7DD
FB2kpp2AEF	<i>a2 b2 kpp2<sup>T182AY184F</sup></i>	Nat <sup>R</sup>	FB2	
SG200kpp2AEF	<i>a1 :mfa2 bW2bE1 kpp2<sup>T182AY184F</sup></i>	Nat <sup>R</sup>	SG200	
FB1kpp2-GFPP <sub>erg1</sub> :fuz7DD	<i>a1 b1 kpp2-GFP ip' [P<sub>erg1</sub>:fuz7DD]ip<sup>s</sup></i>	Nat <sup>R</sup> , Cbx <sup>R</sup>	FB1P <sub>erg1</sub> :fuz7DD	
FB1kpp2K50RP <sub>erg1</sub> :fuz7DD	<i>a1 b1 kpp2K50R-GFP ip' [P<sub>erg1</sub>:fuz7DD]ip<sup>s</sup></i>	Nat <sup>R</sup> , Cbx <sup>R</sup>	FB1P <sub>erg1</sub> :fuz7DD	
FB1kpp2AEFP <sub>erg1</sub> :fuz7DD	<i>a1 b1 kpp2AEF-GFP ip' [P<sub>erg1</sub>:fuz7DD]ip<sup>s</sup></i>	Nat <sup>R</sup> , Cbx <sup>R</sup>	FB1P <sub>erg1</sub> :fuz7DD	
FB1kpp2WTP <sub>erg1</sub> :fuz7DD	<i>a1 b1 kpp2WT ip' [P<sub>erg1</sub>:fuz7DD]ip<sup>s</sup></i>	Nat <sup>R</sup> , Cbx <sup>R</sup>	FB1kpp2WT	
FB1kpp2K50RP <sub>erg1</sub> :fuz7DD	<i>a1 b1 kpp2<sup>K50R</sup> ip' [P<sub>erg1</sub>:fuz7DD]ip<sup>s</sup></i>	Nat <sup>R</sup> , Cbx <sup>R</sup>	FB1kpp2K50R	
FB1kpp2AEFP <sub>erg1</sub> :fuz7DD	<i>a1 b1 kpp2<sup>T182AY184F</sup> ip' [P<sub>erg1</sub>:fuz7DD]ip<sup>s</sup></i>	Nat <sup>R</sup> , Cbx <sup>R</sup>	FB1kpp2AEF	

Tabelle 12: Fortsetzung

Stamm	Genotyp	Resistenz	Ausgangsstamm	Transformation/Southern
FB2kpp2-GFP/P <sub>erg1</sub> :kpp4-2 SG200P <sub>oef</sub> :GFP	<i>a2 b2 kpp2-GFP ip'[P<sub>erg1</sub>:kpp4-2]ip<sup>s</sup></i> <i>a1 :mfa2 bW2bE1 ip'[P<sub>oef</sub>:GFP]ip<sup>s</sup></i>	Nat <sup>R</sup> , Cbx <sup>R</sup> Cbx <sup>R</sup> , Phleo <sup>R</sup>	FB2kpp2-GFP SG200	siehe FBIP <sub>erg1</sub> :kpp4-2 <b>Plasmid</b> <sup>1</sup> : p123 verdaut mit <i>SspI</i> <b>Trans. DNA</b> <sup>2</sup> : <i>BamHI/NorI</i> <b>Sonde</b> <sup>3</sup> : 4,9 kb <i>NorI/NorI</i> - Fragment aus pNEB-Cbx(+) <b>WT</b> <sup>4</sup> : 4,9 kb <b>HR</b> <sup>5</sup> : 5,9 und 4,6 kb siehe SG200P <sub>oef</sub> :GFP
SG200Δkpp4/P <sub>oef</sub> :GFP	<i>a1 :mfa2 bW2bE1 Δkpp4 ip'[P<sub>oef</sub>:GFP]ip<sup>s</sup></i>	Hyg <sup>R</sup> , Cbx <sup>R</sup> , Phleo <sup>R</sup>	SG200Δkpp4	siehe SG200P <sub>oef</sub> :GFP
SG200kpp2AEF/P <sub>oef</sub> :GFP	<i>a1 :mfa2 bW2bE1 kpp2AEF ip'[P<sub>oef</sub>:GFP]ip<sup>s</sup></i>	Nat <sup>R</sup> , Cbx <sup>R</sup> , Phleo <sup>R</sup>	SG200kpp2AEF	siehe SG200P <sub>oef</sub> :GFP
FBIP <sub>erg1</sub> :ras I <sub>QL</sub>	<i>a1 b1 ip'[P<sub>erg1</sub>:ras I<sub>Q67L</sub>]ip<sup>s</sup></i>	Cbx <sup>R</sup>	FB1	<b>Plasmid</b> <sup>1</sup> : pRU1 Iras I <sub>QL</sub> verdaut mit <i>SspI</i> <b>Trans. DNA</b> <sup>2</sup> : <i>BamHI/NorI</i> <b>Sonde</b> <sup>3</sup> : 4,9 kb <i>NorI/NorI</i> - Fragment aus pNEB-Cbx(+) <b>WT</b> <sup>4</sup> : 4,9 kb <b>HR</b> <sup>5</sup> : 5,8 und 3,6 kb

<sup>§</sup> Alle Stämme wurde anhand einer Southern-Analyse überprüft. In der Regel wurden alle Versuche mit zwei unterschiedlichen Transformanten durchgeführt.

<sup>1</sup> Das genannte Plasmid wurde vor der Transformation mit dem entsprechenden Enzym geschnitten.

<sup>2</sup> Für die Southern-Analyse wurde die genomische DNA der Transformanten mit dem genannten Enzym verdaut.

<sup>3</sup> Dieses Fragment wurde für die Southern-Analyse radioaktiv markiert.

<sup>4</sup> Das erwartete mit der verwendeten Sonde hybridisierende Bandenmuster des Ausgangsstamms.

<sup>5</sup> Das erwartete mit der verwendeten Sonde hybridisierende Bandenmuster bei erfolgreicher homologen Rekombination.

<sup>6</sup> Das generierte PCR-Produkt wurde direkt in die Transformation eingesetzt.

#### 4.1.4 Ausgangsplasmide

Sämtliche Plasmide tragen eine Ampicillin-Resistenzkassette zur Selektion in *E. coli*. Alle Klonierungsschritte wurden durch Restriktionsanalyse überprüft, alle eingebrachten PCR-Amplifikate wurden sequenziert.

#### Klonierungsvektoren

**pSP72** (Promega), **pBS(+)**SKII (Stratagene), **pTZ18R** (Pharmacia), **pTZ19R** (Pharmacia), **pSL1180** (Pharmacia), **pNEB193** (NEB), **pCR2.1 - Topo** (Invitrogen).

#### Expressionsvektoren für *E. coli*

**pET15b** (Novagen) ist ein T7-Expressionsvektor für *E. coli*, der die N-terminale Fusion eines hexa-Histidin-Epitops erlaubt.

**pGEX-2T** (Pharmacia) erlaubt die Expression von GST-Fusionsproteinen in *E. coli*.

**pGEX-Kpp2** (MF32)

(M. Feldbrügge, p. Mitteilung)

Diese Plasmid ermöglicht die Expression eines GST-Kpp2-Fusionsproteins in *E. coli*. Dieses Plasmid ist ein pGEX-2T-Derivat, das ein 1,3 kb *NcoI/NotI*-Fragment aus p123kpp2 trägt.

**pGEX-Prf1<sub>441-566</sub>** (pUMa98)

(M. Feldbrügge, p. Mitteilung)

Ein pGEX-2T-Derivat, das die Expression eines GST-Prf1<sub>441-566</sub>-Fusionsproteins in *E. coli* ermöglicht.

**pGEX-Kpp6C-term** (pUMa 86)

(M. Feldbrügge, p. Mitteilung)

Ein pGEX-2T-Derivat, das die Expression eines GST-Kpp6<sub>170-533</sub>-Fusionsproteins in *E. coli* ermöglicht.

#### „Two-Hybrid“-Vektoren

**pGAD424** (Bartel *et al.*, 1993)

Enthält eine 2  $\mu$ -Region, das *LEU2*-Markergen, den *ADHI*-Promotor, gefolgt von einem Kernlokalisierungssignal, der GAL4-Aktivierungsdomäne, einem Polylinker und dem *ADHI*-Terminator. Ermöglicht die N-terminale Fusion der GAL4-Aktivierungsdomäne an ein Protein der Wahl.

**pGBT9** (Bartel *et al.*, 1993)

Enthält eine 2  $\mu$ -Region, das *TRP1*-Markergen, den *ADHI*-Promotor, gefolgt von einem Kernlokalisierungssignal, der GAL4-DNA-Bindedomäne, einem Polylinker und dem *ADHI*-Terminator. Ermöglicht die N-terminale Fusion der GAL4-DNA-Bindedomäne an ein Protein der Wahl.

**pLexA (Clontech)**

Enthält eine 2  $\mu$ -Region, das *HIS3*-Markergen, den *ADHI*-Promotor, gefolgt von der LexA-DNA-Bindedomäne, einem Polylinker und dem *ADHI*-Terminator. Ermöglicht die N-terminale Fusion der LexA4-DNA-Bindedomäne an ein Protein der Wahl.

**pB42AD** (Clontech)

Enthält eine 2  $\mu$ -Region, das *TRP1*-Markergen, den *GALI*-Promotor, gefolgt von einem Kernlokalisierungssignal, einem (His)<sub>10</sub>-Epitop, dem B42-Transaktivierungspeptid, einem Polylinker und dem *ADHI*-Terminator. Ermöglicht die N-terminale Fusion der B42AD-Peptids an ein Protein der Wahl.

**p8op-lacZ**

Enthält eine 2  $\mu$ -Region, das *URA3*-Markergen, acht LexA-Operatorstellen gefolgt von dem *LacZ*-Reporter. Ermöglicht die Quantifizierung der positiven Interaktionen im „Two-Hybrid“-Test anhand der *LacZ*-Expression.

**pGAD-Ras1** (J. Katzenberger, p. Mitteilung)

Ein pGAD424-Derivat, das die Expression von Fusionsproteinen der GAL4-Aktivierungsdomäne mit Ras1 ermöglicht.

**pGAD-Ras2** (J. Katzenberger, p. Mitteilung)

Ein pGAD424-Derivat, das die Expression von Fusionsproteinen der GAL4-Aktivierungsdomäne mit Ras2 ermöglicht.

**pLexA-Kpp6** (M. Feldbrügge, p. Mitteilung)

Ein pLexA-Derivat, das die Expression eines LexA-Kpp6 Fusionsproteins in *S. cerevisiae* ermöglicht.

#### Spezielle Vektoren für das Arbeiten in/mit *U. maydis*

**pBS-hhn** (J. Kämper, pers. Mitteilung)

Enthält eine 1,9 kb Hygromycin-Resistenzkassette als *SfiI*-Fragment.

**pSL-Cbx(+)**, **pSL-Cbx(-)** (Brachmann, 2001)

Enthalten die Carboxin-Resistenzkassette als 1.939 bp *NotI*-Fragment in unterschiedlichen Orientierungen.

**pSL-Hyg(+)**, **pSL-Hyg(-)** (Brachmann, 2001)

Enthalten die Hygromycin-Resistenzkassette als 2.896 bp *NotI*-Fragment in unterschiedlicher Orientierung.

**pNEB-Cbx(+), pNEB-Cbx(-)** (Brachmann, 2001)

Enthalten die Carboxin-Resistenzkassette als 1.939 bp *NotI*-Fragment in unterschiedlichen Orientierungen.

**pNEB-Hyg(+), pNEB-Hyg(-)** (Brachmann, 2001)

Enthalten die Hygromycin-Resistenzkassette als 2.896 bp *NotI*-Fragment, in unterschiedlichen Orientierungen.

**pNEB-Nat(+), pNEB-Nat(-)** (Brachmann, 2001)

Enthalten die Nourseothricin-Resistenzkassette als 1.467 bp *NotI*-Fragment in unterschiedlichen Orientierungen

**pNEBUH** (Weinzierl, 2001)

Dieses Plasmid ist ein pNEB193-Derivat, enthält eine Hygromycin-Resistenzkassette, die UARS und ist damit ein frei-replizierendes Plasmid für *U. maydis*.

**pNEBUC** (Weinzierl, 2001)

Dieses Plasmid ist ein pNEB193-Derivat, enthält eine Carboxin-Resistenzkassette, die UARS und ist damit ein frei-replizierendes Plasmid für *U. maydis*.

**pCU3** (Brachmann, 2001)

Enthält das *GFP*-Gen unter der Kontrolle des *tefl*-Promotors und des *nos*-Terminators, sowie eine Carboxin-Resistenzkassette.

**pCU4** (Brachmann, 2001)

Enthält das *GFP*-Gen unter der Kontrolle des *otef*-Promotors und des *nos*-Terminators sowie eine Carboxin-Resistenzkassette.

**pRU11** (Brachmann, 2001)

Enthält das *GFP*-Gen unter der Kontrolle des 3,5 kb-Fragmentes des *crgI*-Promotors und des *nos*-Terminators, sowie eine Carboxin-Resistenzkassette.

**p123** (C. Aichinger, pers. Mitteilung)

Enthält das *GFP*-Gen unter der Kontrolle des *otef*-Promotors, des *nos*-Terminator, sowie eine Carboxin-Resistenzkassette.

**pG101** (Weinzierl, 2001)

Vektor für die frei-replizierende cDNA-Bank. Enthält den *mfa2*-Terminator.

**Freireplizierende cDNA-Bank** (Weinzierl, 2001)

Freireplizierende cDNA-Bank einer Kreuzung der Stämme FB1 (*a1 b1*) und FB2 (*a2 b2*) nach Wachstum auf aktivkohlehaltigem Vollmedium (für 12, 24 und 48 Stunden). Erstellt in Anlehnung an den cDNA-Library-Kit von Clontech.

**Cosmidbank pUMcos<sup>x</sup>** (Bölker *et al.*, 1995a)

Cosmidbank des *U. maydis*-Stammes FBD11 (*a1a2 b1b2*).

**λgt10 cDNA-Bank** (Schauwecker *et al.*, 1995)

cDNA-Bank des Stammes FBD11 (*a1a2 b1b2*) nach Wachstum auf aktivkohlehaltigem Vollmedium. Erstellt mit dem cDNA-Bank-Kit von Amersham.

**pkpp2H** (Müller *et al.*, 1999)

Dieses pTZ19R-Derivat enthält ein genomisches 4,4 kb *HindIII*/*HindIII*-Fragment, das aus der EMBL3-Phagen-Bank (Schulz *et al.*, 1990) isoliert wurde.

**pKpp4H** (P. Müller, nicht veröffentlicht)

Dieses pTZ19R-Derivat trägt ein genomisches 5,3 kb *HindIII*/*HindIII*-Fragment, das aus der EMBL3-Phagen-Bank (Schulz *et al.*, 1990) isoliert wurde. Dieses Fragment umfasst 2,0 kb des *kpp4*-ORFs und 3,2 kb 3'-Bereich.

**pKpp4B** (P. Müller, nicht veröffentlicht)

Dieses pTZ19R-Derivat trägt ein genomisches 7,4 kb *BamHI*/*BamHI*-Fragment, das aus der EMBL3-Phagen-Bank (Schulz *et al.*, 1990) isoliert wurde. Dieses Fragment umfasst den gesamten *kpp4*-ORF mit 2,1 kb 5'-Bereich und 0,6 kb 3'-Bereich.

**pFuz7S** (pHA42)

(A. Hartmann, persönliche Mitteilung)

Dieses Plasmid ist ein pSP72-Derivat und enthält ein genomisches 3,3 kb *SphI*/*SphI*-Fragment aus pFuz7 (Regenfelder *et al.*, 1997). Dieses Fragment enthält den *fuz7*-ORF und 1,8 kb 5'-Bereich sowie 0,2 kb 3'-Bereich.

**pΔfuz7** (pGE1)

(G. Weinzierl, persönliche Mitteilung)

Diese Plasmid wurde für die Herstellung der *fuz7*-Deletionsstämme verwendet. pΔ *fuz7* ist ein pFuz7S-Derivat, in dem ein 0,9 kb *NaeI*/*NsiI*-Fragment, das den *fuz7*-ORF von +146 - +1057 bp umfasst, durch die Nourseothricin-Resistenzkassette ersetzt wurde. Diese Kassette kam als 1,5 kb *StuI*/*PstI*-Fragment aus pSL-Nat(+).

**pRF-4.7H** (Hartmann *et al.*, 1999)

Ein pSP72-Derivat, das ein genomisches 4,7 kb *HindIII*/*HindIII*-Fragment enthält, welches den gesamten *prf1*-Locus umfasst.

**pRF<sup>con</sup>** (Hartmann *et al.*, 1999)

Enthält *prf1* unter der Kontrolle des *tefl*-Promotors und eine Carboxin-Resistenzkassette. Dieses Plas-

mid kann dazu verwendet werden, in *U. maydis* das endogene *prf1*-Allel mit *prf1<sup>con</sup>* auszutauschen  
**MF29** (M. Feldbrügge, p. Mitteilung)  
 Enthält *prf1-E1*-Allel unter der Kontrolle des *tef1*-Promotors und eine Hygromycin-Resistenzkassette. Dieses Plasmid kann dazu verwendet werden, in *U. maydis* das endogene *prf1*-Allel mit *prf1<sup>con</sup>* auszutauschen

**pUbc1** (Hartmann *et al.*, 1999)

Ein pTZ19R-Derivat, das ein genomisches 3,6 kb *EcoRI/EcoRI*-Fragment des *ubc1*-Locus enthält.

**pRas1E** (Müller *et al.*, 2003a)

Ein pTZ18R-Derivat, das ein genomisches 3,5 kb *EcoRI/EcoRI*-Fragment enthält, welches den gesamten ORF von *ras1* sowie 1,3 kb 5' und 1,4 kb 3'-Bereiche umfasst.

## Plasmide für die Herstellung von Hybridisierungs sonden

**pCBX122** (Keon *et al.*, 1991)

Ein Derivat von pCM54, das anstatt der Hygromycin- eine Carboxin-Resistenzkassette als 3,2 kb *EcoRI/HindIII*-Fragment und eine UARS enthält.

**pfrb34** (Brachmann, 2001)

Enthält ein 1.055 bp *EcoRI/EcoRI*-Fragment des Amplicons *frb34*, das in pCR-Topo kloniert wurde.

**pSP4,2EcoRV** (Bölker *et al.*, 1992)

Enthält ein 4,2 kb *EcoRV*-Fragment aus dem *a1*-Locus.

**pTZa2XhoI,5#3** (Bölker *et al.*, 1992)

Enthält ein 3,5 kb *XhoI*-Fragment aus dem *a2*-Locus.

**pbW2-NdeI-bE1** (Brachmann, 2001)

Enthält ein intronfreies 1.837 bp *NdeI/PvuII*-5'-Fragment von *bW2* und ein intronfreies 761 bp *NdeI/PvuII*-5'-Fragment von *bE1*.

## 4.1.5 In dieser Arbeit hergestellte Plasmide

### 4.1.5.1 *kpp4*-Plasmide

#### Hilfskonstrukte

**pKpp4B/H**

Dieses pSP72-Derivat trägt ein genomisches 2,5 kb *HindIII/BamHI*-Fragment, das aus dem Cosmid 23D2 isoliert wurde. Dieses Fragment enthält

2,0 kb des *kpp4*-ORFs und 0,6 kb 3'-Bereich und wurde isoliert, da in dem Plasmid pKpp4B nach erneuter Amplifikation in *E. coli* mehrere Sequenzfehler entdeckt wurden.

**pKpp4-2-I**

Dieses Plasmid enthält das *kpp4-2*-Allel. Für die Konstruktion wurde ein 0,5 kb *NheI/PvuII*-Fragment aus pKpp4B und ein 4,75 kb *PvuII*/(abgedaut)/*HindIII*-Fragment aus pKpp4H in die *XbaI/HindIII*-Schnittstellen von pBS-SKII(+) ligiert. Die Sequenzierung des *PvuII*-(abgedaut)/*PvuII* Übergangs in pKpp4-2-I bestätigte die korrekte Fusion in *kpp4-2*. Kpp4-2 kodiert damit für ein Protein, das im Vergleich zu Kpp4 der Bereich von 45 - 1055 aa fehlt.

**pTZ19Rkpp4-NotI-tef1-XmaI**

Dieses Plasmid diene als Hilfskonstrukt für pTEF-kpp4WT, pTEF-kpp4-2, pTEF-kpp4RA und pTEF-kpp4PS. Für die Konstruktion wurde der 5'-Bereich von *kpp4* als 0,8 kb *EcoRI/NotI*-Fragment (hergestellt in einer PCR Reaktion mit den Oligonukleotiden kpp4-739 und kpp4+1NotI) mit dem *tef1*-Promotor als 0,7 kb *NotI/NdeI*-Fragment aus pCU3 und phosphorylierten, doppelstängigen Oligonukleotiden (hergestellt aus kpp4Linker-I und kpp4Linker-II), die an Position +1 des *kpp4*-ORFs eine *NdeI*-Schnittstelle generieren, in die *EcoRI/XmaI* Schnittstellen von pTZ19R, ligiert. Damit umfasst dieses Plasmid den 5'-Bereich von *kpp4* und den *tef1*-Promotor fusioniert mit den ersten 26 bp des *kpp4*-ORFs.

**pTEF-kpp4WT**

Das Vorläufer Konstrukt pTZ19Rkpp4-NotI-tef1-XmaI wurde mit *XmaI/HindIII* geöffnet und 2,7 kb des *kpp4*-ORFs als *XmaI/HindIII*-Fragment aus kpp4B inseriert.

**pTEF-kpp4RA**

Das Vorläufer Konstrukt pTZ19Rkpp4-NotI-tef1-XmaI wurde mit *XmaI/HindIII* geöffnet und *kpp4RA* als drei Fragmente eingefügt: a) ein 1,1 kb *XmaI/Eco47III*-Fragment aus pKpp4B; b) ein 0,55 kb *Eco47III/SphI*-Fragment, das die Mutationen A1441G und G1443A enthält und durch gerichteter PCR-Mutagenese mit den Oligonukleotiden kpp4RAIII, kpp4RAIV und kpp4RAV hergestellt wurde; c) ein 0,95 kb *SphI/HindIII*-Fragment aus pKpp4B. Damit unterscheidet sich pTEF-kpp4RA von pTEF-kpp4WT nur in den *kpp4RA*-Mutationen, die eine *EcoRI*-Schnittstelle eingeführt haben.

**pTEF-kpp4PS**

Das Vorläufer Konstrukt pTZ19Rkpp4-NotI-tef1-XmaI wurde mit *XmaI/HindIII* geöffnet und *kpp4PS* als drei Fragmente eingefügt: a) ein 1,9 kb *XmaI/BstYI*-Fragment aus pKpp4B; b) ein 0,2 kb *BstYI/BstEII*-Fragment, das die Mutationen G2040A, C2041T und T2043G enthält und durch gerichteter PCR-Mutagenese mit den Oligonukleotiden kpp4PS und kpp4+2239, hergestellt wurde; c) ein 0,47 kb *BstEII/HindIII*-Fragment aus pKpp4B. Damit unterscheidet sich pTEF-kpp4PS von pTEF-kpp4WT nur in den *kpp4PS*-Mutationen, die eine *PvuI*-Schnittstelle eingeführt haben.

**pTEF-kpp4-2**

Das Vorläufer Konstrukt pTZ19Rkpp4-NotI-tef1-XmaI wurde mit *XmaI/PstI* geöffnet und der *kpp4-2*-ORF als 1,1 kb *XmaI/NsiI*-Fragment aus pkpp4-2-I inseriert.

**pTZ19R-kpp4KD**

Mit den Oligonukleotiden kpp4+974 und kpp4+1490 wurde der Bereich von *kpp4*, der für die katalytische Domäne vom 1053 - 1566 aa kodiert, amplifiziert. Das PCR-Produkt wurde mit den Enzymen *EcoRI* und *BamHI* geschnitten und in die entsprechenden Schnittstellen in pTZ19R ligiert.

**pTZ-kpp4RD**

Mit den Oligonukleotiden kpp4+1 und kpp4+964 wurde der Bereich von *kpp4*, der für die regulatorische Domäne von 1 - 964 aa kodiert, amplifiziert. Das PCR-Produkt wurde mit den Enzymen *EcoRI* und *BamHI* geschnitten und in die entsprechenden Schnittstellen in pTZ19R ligiert.

**Frei-replizierende Plasmide****pUCkpp4WT**

Diese Plasmid ist ein pNEBUC-Derivat und enthält zwischen seinen *EcoRI/BamHI*-Schnittstellen ein 3,5 kb *EcoRI/HindIII*-Fragment aus pTEF-kpp4-kpp4WT und ein 2,5 kb *HindIII/BamHI*-Fragment aus pkpp4H. Damit besitzt dieses Konstrukt den gesamten *kpp4*-ORF unter der Kontrolle des *tef1*-Promotors und 0,5 kb des 3'-Bereichs. pUCkpp4WT kann als frei-replizierendes Plasmid in *U. maydis* eingebracht werden und wurde für die Komplementation der *kpp4*-Deletionsmutanten verwendet (nicht gezeigt).

**pUC-kpp4-2**

Diese Plasmid ist ein pNEBUC--Derivat und enthält zwischen seinen *EcoRI/BamHI*-Schnitt-

stellen ein 1,5 kb *EcoRI/BsrGI*-Fragment aus pTEF-kpp4-2 und eine 1,7 kb *BsrGI/BamHI*-Fragment aus pKpp4H. Damit enthält dieses Konstrukt den gesamten *kpp4-2*-ORF unter der Kontrolle des *tef1*-Promotors und 0,5 kb des 3'-Bereichs.

**Plasmide für homologe Rekombination in *U. maydis*****pkpp4-1**

Mit diesem Plasmid wurden alle *kpp4*-Deletionsmutanten hergestellt. Für die Konstruktion dieses Plasmids wurden drei Fragmente in den mit *BamHI* und *EcoRI* geöffneten Vektor pTZ19R ligiert: a) ein 2,1 kb *BamHI/XmaI*-Fragment aus pKpp4B umfasst den 5'-Bereich von *kpp4*; b) ein 3 kb *AgeI/SpeI*-Fragment aus pSLHyg(-) enthält die Hygromycin-Resistenz-kassette; c) ein 0,5 kb *AvrII/EcoRI*-Fragment aus pKpp4B beinhaltet den 3'-Bereich von *kpp4*. Damit ist in pKpp4-1 der ORF von *kpp4* von Position + 24 bp (*XmaI*-Schnittstelle) bis 74 bp (*AvrII*-Schnittstelle) nach dem STOP-Codon durch eine Hygromycin-Resistenz-kassette ersetzt worden.

**p123crg1kpp4-2**

Diese Plasmid dient der homologen Rekombination von *P<sub>crg1</sub>:kpp4-2* in den *ip*-Locus von *U. maydis* und damit zur regulierten Expression von *kpp4-2*. Für die Konstruktion wurde das Plasmid p123 mit *NotI* und *HindIII* geschnitten (dadurch wird der *otef*-Promotor und das *GFP*-Gen deletiert) und mit einem 3,5 kb *NotI/NdeI*-Fragment aus pRU11, das den *crg1*-Promotor umfasst und einem 2,3 kb *NdeI/HindIII*-Fragment aus pUCkpp4-2 ligiert. Damit wurde *kpp4-2* und 0,5 kb des 3'-Bereichs an den *crg1*-Promotor fusioniert.

**p123crg1kpp4PS**

Diese Plasmid dient der homologen Rekombination von *P<sub>crg1</sub>:kpp4PS* in den *ip*-Locus von *U. maydis* und damit zur regulierten Expression von *kpp4PS*. Für die Konstruktion wurde das Plasmid p123 mit *NotI* und *Acc65I* geschnitten und mit einem 3,5 kb *NotI/NdeI*-Fragment aus pRU11, das den *crg1*-Promotor umfasst, einem 2,7 kb *NdeI/HindIII*-Fragment aus pTEF-kpp4PS und einem 2,5 kb *HindIII/Acc65I*-Fragment aus pkpp4H ligiert. Damit wurde *kpp4<sup>P681S</sup>* und 0,5 kb des 3'-Bereichs an den *crg1*-Promotor fusioniert.



**pKpp4WT-tef-Hyg(-)**

Dieses Plasmid ermöglicht im endogenen *kpp4*-Locus die Expression von *kpp4* unter der Kontrolle des *tef1*-Promotors. Dieses Plasmid ist aus pTEF-*kpp4*WT hervorgegangen, indem dieses Plasmid mit *NotI* linearisiert wurde und die Hygromycin-Resistenzkassette als 2,9 kb *NotI/NotI*-Fragment aus pSLHyg(-) eingefügt wurde. Das Minuszeichen im Namen des Plasmids bezeichnet die entgegengesetzte Orientierung des *hph*-Gens der Hygromycin-Resistenzkassette und *kpp4*.

**pKpp4RA-tef-Hyg(-)**

Dieses Plasmid ermöglicht im endogenen *kpp4*-Locus die Expression von *kpp4*<sup>K481E</sup> unter der Kontrolle des *tef1*-Promotors und ging aus pTEF-*kpp4*RA hervor, indem in die *NotI*-Schnittstelle die Hygromycin-Resistenzkassette als 2,9 kb *NotI/NotI*-Fragment aus pSLHyg(-) eingefügt wurde. Damit ist pKpp4RA-tef-Hyg(-) bis auf die Mutationen A1441G und G1443A mit pKpp4WT-tef-Hyg(-) identisch.

**Plasmide für die „Two-Hybrid“-Tests****pGAD-kpp4RD**

Für dieses Plasmid wurde das 2,9 kb *EcoRI/EcoRI*-Fragment aus pTZ19R-*kpp4*RD in den *EcoRI/BamHI*-geschnittenen Vektor pGAD424 ligiert. Dieses Plasmid ermöglicht die Expression eines Fusionsproteins aus der Gal4-Aktivierungsdomäne und der regulatorischen Domäne von Kpp4 (1 - 964 aa) in *S. cerevisiae*.

**pGAD-kpp4RA**

Dieses Plasmid unterscheidet sich von pGAD-*kpp4*RD nur in der RA-Mutation. Für die Konstruktion wurde ein 2,7 kb *XmaI/HindIII*-Fragment und ein 0,5 kb *HindIII/BstYI*-Fragment, beide aus pTEF-*kpp4*RA in pGAD-*kpp4*RD ligiert, der mit *XmaI/BamHI*-geschnitten war. Dieses Plasmid ermöglicht damit die Expression eines Fusionsproteins aus der Gal4-Aktivierungsdomäne und der regulatorischen Domäne von Kpp4RA (1 - 964 aa) in *S. cerevisiae*.

**pGAD-kpp4PS**

Dieses Plasmid unterscheidet sich von pGAD-*kpp4*RD nur in der P681S-Mutation. Für die Konstruktion wurde ein 2,7 kb *XmaI/HindIII*-Fragment und ein 0,5 kb *HindIII/BstYI*-Fragment, beide aus pTEF-*kpp4*PS in pGAD-*kpp4*RD ligiert, der mit *XmaI/BamHI* geschnitten war. Dieses

Plasmid ermöglicht damit die Expression eines Fusionsproteins aus der Gal4-Aktivierungsdomäne und der regulatorischen Domäne von Kpp4PS (1 - 964 aa) in *S. cerevisiae*.

**pGAD-kpp4KD**

Für dieses Plasmid wurde 1,5 kb *EcoRI/BamHI*-Fragment aus pTZ19R-*kpp4*KD in den *EcoRI/BamHI*-geschnittenen Vektor pGAD424 ligiert. Dieses Plasmid ermöglicht damit die Expression eines Fusionsproteins aus der Gal4-Aktivierungsdomäne fusioniert und der katalytischen Domäne von Kpp4 (1053 - 1566 aa) in *S. cerevisiae*.

**pGBT-kpp4KD**

Für dieses Plasmid wurde 1,5 kb *EcoRI/BamHI*-Fragment aus pTZ19R-*kpp4*KD in den *EcoRI/BamHI*-geschnittenen Vektor pGBT9 ligiert. Dieses Plasmid ermöglicht damit die Expression eines Fusionsproteins aus der Gal4-DNA-Bindedomäne und der katalytischen Domäne von Kpp4 (1053 - 1566 aa) in *S. cerevisiae*.

**pGAD-kpp4**

Für dieses Plasmid wurde das 2,7 kb *EcoRI/HindIII*-Fragment aus pGAD-*kpp4*RD, ein 1,6 kb *HindIII/MluI*-Fragment aus p*kpp2H/B* und ein 0,4 kb *MluI/BamHI*-Fragment aus pGAD-*Kpp4KD* in den *EcoRI/BamHI*-geschnittenen Vektor pGAD424 ligiert. Dieses Plasmid ermöglicht die Expression eines Fusionsproteins aus der Gal4-Aktivierungsdomäne und Kpp4 (1 - 1566 aa) in *S. cerevisiae*.

**pGBT-kpp4**

Dieses Plasmid wurde wie pGAD-*kpp4* konstruiert, mit Ausnahme, dass die Fragmente in den Vektor pGBT9 ligiert wurden. Dieses Plasmid ermöglicht die Expression eines Fusionsproteins aus der Gal4-DNA-Bindedomäne und Kpp4 (1 - 1566 aa) in *S. cerevisiae*.

**pLexA-kpp4KD**

Für dieses Plasmid wurde das 1,5 kb *EcoRI/BamHI*-Fragment aus pTZ19R-*kpp4*KD in den *EcoRI/BamHI*-geschnittenen Vektor pLexA ligiert. Dieses Plasmid ermöglicht die Expression der LexA-Kpp4KD Fusionsproteine in *S. cerevisiae*.

**pB42AD-kpp4KD**

Für dieses Plasmid wurde ein 1,2 kb *EcoRI/SacII*-Fragment zusammen mit einem 0,3 kb *SacII/XhoI*-Fragment, beide aus pLexA-*kpp4*KD, in den *EcoRI/XhoI*-geschnittenen Vektor pB42AD ligiert.

Dieses Plasmid ermöglicht die Expression der B42-Kpp4KD Fusionsproteine in *S. cerevisiae*.

#### **pLexA-kpp4RD**

Für dieses Plasmid wurde das 2,9 kb *EcoRI/BamHI*-Fragment aus pTZ19R-kpp4RD in den *EcoRI/BamHI*-geschnittenen Vektor pLexA ligiert. Dieses Plasmid ermöglicht die Expression der LexA-Kpp4RD Fusionsproteine in *S. cerevisiae*.

#### **pB42AD-kpp4RD**

Für dieses Plasmid wurde ein 2,4 kb *EcoRI/RsrII*-Fragment zusammen mit einem 0,5 kb *RsrII/XhoI*-Fragment, beide aus pLexA-kpp4RD in den *EcoRI/XhoI*-geschnittenen Vektor pB42AD ligiert. Dieses Plasmid ermöglicht die Expression der B42-Kpp4RD Fusionsproteine in *S. cerevisiae*.

#### **pLexA-kpp4**

Für dieses Plasmid wurde der *kpp4*-ORF als 4,7 kb *EcoRI/BamHI*-Fragment aus pGAD-kpp4 in *EcoRI/BamHI*-geschnittenen pLexA ligiert. Dieses Plasmid ermöglicht die Expression der LexA-Kpp4 Fusionsproteine in *S. cerevisiae*.

#### **pB42AD-kpp4**

Für dieses Plasmid wurde der *kpp4*-ORF als 4,4 kb *EcoRI/SacII*-Fragment aus pLex-kpp4 und 0,4 kb *SacII/XhoI* aus pLexA-kpp4KD in *EcoRI/XhoI*-geschnittenen pB42AD ligiert. Dieses Plasmid ermöglicht die Expression der B42-Kpp4 Fusionsproteine in *S. cerevisiae*.

### **Plasmide für die Proteinexpression in *E. coli***

#### **pET-kpp4-2**

Dieses Plasmid ermöglicht die Expression eines (His)<sub>6</sub>-Kpp4-2-Fusionsproteins in *E. coli*. Für die Konstruktion wurde pET15b *NdeI/BamHI* linearisiert und mit den folgenden Fragmenten ligiert: 1,3 kb *NdeI/MluI* aus pUC-kpp4-2 und 0,4 kb *MluI/BamHI* aus pGADkpp4KD.

#### **pGEX-kpp4-2**

Dieses Plasmid ermöglicht die Expression eines GST-Kpp4-2-Fusionsproteins in *E. coli*. Für die Konstruktion wurde pGEX-2T mit *BamHI* linearisiert, dephosphoryliert und mit den folgenden Fragmenten ligiert: 1,3 kb *BamHI/SacII* aus pUC-kpp4-2 und 0,3 kb *SacII/BamHI* aus pGADkpp4KD.

### **4.1.5.2 *fuz7*-Plasmide**

#### **Hilfskonstrukte**

##### **pSL-tef1-fuz7DD**

Dieses Plasmid entstand aus der Ligation von 4 Fragmenten: a) der *tef1*-Promotor als 0,7 kb *NotI/NdeI*-Fragment aus pCU3; b) ein 0,8 kb *NdeI/AflIII*-Fragment, das die Mutationen A775G, G767A, C767T, T780, A787G, C788A und G789C enthält und durch gerichteter PCR-Mutagenese mit den Oligonukleotiden *fuz7DD* und *fuz7+1NdeI* hergestellt wurde. Dabei wurde im Vergleich zu der Wildtyp-Sequenz eine *EcoRV*-Schnittstelle generiert und eine *AflIII*-Schnittstelle zerstört; c) ein 0,7 kb *AflIII/SphI*-Fragment aus pFuz7S, das den 3'-Bereich des *fuz7*-ORFs inklusive 0,15 kb 3'-Bereich enthält; d) der Vektor pSL1180 *NotI/SphI* geschnitten. Im fertigen Plasmid war damit *fuz7DD* unter der Kontrolle des *tef1*-Promotors.

##### **pCRfuz7B/N**

Dieses Plasmid ist ein pCR2.1-Topo-Derivat, das ein PCR-Produkt, hergestellt mit den Oligonukleotiden *fuz7EcoRI/BamHI*-5' / *fuz7NotI/XhoI*-3' hergestellt wurde und beinhaltet den gesamten *fuz7*ORF.

### **Plasmide für homologe Rekombination in *U. maydis***

##### **p123fuz7DD**

Dieses Plasmid dient der homologen Rekombination von *P<sub>tef1</sub>:fuz7DD* in den *ip*-Locus von *U. maydis* und damit zur konstitutiven Expression von *fuz7DD*. Ein p123-Derivat, in dem das 1,6 bp *NotI/SphI*-Fragment, das den *otef*-Promotor und *EGFP*-Gen umfasst, mit dem *NotI/SphI*-Fragment aus pSL-tef1-fuz7DD ausgetauscht wurde.

##### **p123crg1fuz7DD**

Dieses Plasmid dient der homologen Rekombination von *P<sub>crg1</sub>:fuz7DD* in den *ip*-Locus von *U. maydis* und damit zur regulierbaren Expression von *fuz7DD*. Für die Konstruktion wurde das Plasmid p123 mit *NotI* und *SphI* geschnitten und mit einem 3,5 kb *NotI/NdeI*-Fragment aus pRU11 und einem 1,4 kb *NdeI/SphI*-Fragment aus pSL-tef1-fuz7DD ligiert. Damit wurde *fuz7DD* und 0,15 kb des 3'-Bereichs an den *crg1*-Promotor fusioniert.

## Plasmide für die „Two-Hybrid“-Tests

### pGAD-Fuz7DD

Für dieses Plasmid wurde der Vektor pGAD424 mit *SmaI/BamHI* geöffnet und ein 1,5 kb *NdeI*(aufgefüllt)/*BamHI*-Fragment aus pSL-tef1-fuz7DD eingeführt. Dieses Plasmid sollte damit die Expression eines Fusionsproteins aus der Gal4-Aktivierungsdomäne und Fuz7DD in *S. cerevisiae* ermöglichen.

### pGBT-Fuz7DD

Dieses Plasmid entstand wie pGAD-fuz7DD, nur wurde der Vektor pGBT9 verwendet und sollte damit die Expression eines Fusionsproteins aus der Gal4-DNA-Bindedomäne und Fuz7DD in *S. cerevisiae* ermöglichen.

### pGAD-Fuz7

Für dieses Plasmid wurde der Vektor pGAD424 mit *EcoRI/BamHI* geöffnet und mit einem 0,3 kb *EcoRI/HindIII*-Fragment aus pGBT-fuz7DD und einem 1,2 kb *HindIII/BamHI*-Fragment aus pFuz7S, ligiert. Dieses Plasmid sollte damit die Expression eines Fusionsproteins aus der Gal4-Aktivierungsdomäne und Fuz7 in *S. cerevisiae* ermöglichen.

### pGBT-Fuz7

Dieses Plasmid entstand wie pGAD-fuz7, nur wurde der Vektor pGBT9 verwendet und sollte damit die Expression eines Fusionsproteins aus der Gal4-DNA-Bindedomäne und Fuz7 in *S. cerevisiae* ermöglichen.

### pB42AD-Fuz7

Für dieses Plasmid wurde der Vektor pB42AD mit *EcoRI/XhoI* geöffnet und mit einem 0,7 kb *EcoRI/AatII*- und einem 0,8 kb *AatII/SalI*-Fragment, beide aus pGBT-fuz7, ligiert. Dieses Plasmid sollte damit die Expression von B42-Fuz7 Fusionsproteinen in *S. cerevisiae* ermöglichen.

### pLexA-Fuz7

Dieses Plasmid entstand wie pB42AD-Fuz7, nur wurde der Vektor pLexA verwendet und sollte damit die Expression von LexA-Fuz7 Fusionsproteinen in *S. cerevisiae* ermöglichen.

### pB42AD-Fuz7-II

Dieses Plasmid diente dem gleichen Zweck wie pB42AD-Fuz7, wurde aber unabhängig kloniert und getestet. Für die Konstruktion wurde die 0,7 kb *EcoRI/AatII*- und 0,6 kb *AatII/XhoI*-Fragmente aus pCRfuz7B/N in pB42AD ligiert.

## Plasmide für die Proteinexpression in *E. coli*

### pET-Fuz7

Dieses Plasmid ermöglicht die Expression eines (His)<sub>6</sub>-Fuz7-Fusionsproteins in *E. coli*. Für die Konstruktion wurde der Vektor pET15b mit *NdeI/BamHI* geschnitten und mit den Fragmenten 0,3 kb *NdeI/HindIII* aus p123fuz7DD sowie 1,1 kb *HindIII/BamHI* aus pFuz7S ligiert.

### pET-Fuz7DD

Dieses Plasmid ermöglicht die Expression eines (His)<sub>6</sub>-Fuz7DD-Fusionsproteins in *E. coli*. Für die Konstruktion wurde der Vektor pET15b mit *NdeI/BamHI* geschnitten und dem 1,5 kb *NdeI/BamHI*-Fragment aus p123fuz7DD ligiert.

### pGEX-Fuz7DD

Dieses Plasmid ermöglicht die Expression eines GST-Fuz7DD Fusionsproteins in *E. coli*. Für die Konstruktion wurde MF31 (ein pGEXT-2T-Derivat) mit *NcoI/EcoRI* geschnitten und mit einem 1,6 kb *NcoI/MunI*-Fragment aus pET-Fuz7DD ligiert.

### pGEX-Fuz7DD

Dieses Plasmid ermöglicht die Expression eines GST-Fuz7DD-Fusionsproteins in *E. coli*. Für die Konstruktion wurde pGEX-Fuz7DD (ein pGEXT-2T-Derivat) mit *NcoI/SphI* geschnitten und mit einem 1,6 kb *NcoI/SphI*-Fragment aus pET-Fuz7 ligiert.

### 4.1.5.3 *kpp2*-Plasmide

#### Hilfskonstrukte

#### p123kpp2

Dieses Plasmid dient der homologen Rekombination von *P<sub>otef</sub>:kpp2* in den *ip*-Locus von *U. maydis* und ermöglicht damit die Überexpression von *kpp2*. p123kpp2 ist ein p123-Derivat, in dem das *GFP*-Gen durch ein 1 kb *NcoI/NotI*-Fragment ersetzt wurde, das den gesamten *kpp2*-ORF umfasst und mittels PCR mit den Oligonukleotiden kpp2A und kpp2B hergestellt wurde.

#### p123kpp2AEF

Dieses Plasmid dient der homologen Rekombination von *P<sub>otef</sub>:kpp2AEF* in den *ip*-Locus von *U. maydis* und ermöglicht damit die Überexpression von *kpp2AEF*. p123kpp2AEF ist ein p123-Derivat, in dem das *GFP*-Gen durch ein 1 kb *NcoI/NotI*-

Fragment ersetzt wurde, das den gesamten *kpp2AEF*-ORF umfasst. Die AEF-Mutationen A544G und A551T generieren eine *EcoRI*-Schnittstelle und wurden mittels direkter PCR-Mutagenese mit den Oligonukleotiden *kpp2C*, *kpp2D* und *kpp2B* hergestellt.

#### **p123kpp2K50R**

Dieses Plasmid dient der homologen Rekombination von *P<sub>oref</sub>-kpp2K50R* in den *ip*-Locus von *U. maydis* und ermöglicht damit die von *kpp2K50R*. *p123kpp2* ist ein *p123*-Derivat, in dem das *GFP*-Gen durch ein 1 kb *NcoI/NotI*-Fragment ersetzt wurde, das den gesamten *kpp2K50R*-ORF umfasst und mittels PCR mit den Oligonukleotiden *kpp2A* und *kpp2B* auf *pKpp2K50R-hom-I* (siehe unten) hergestellt wurde.

#### **pkpp2WT-hom-I**

Dieses Plasmid ist ein *pTZ19R*-Derivat und ein Vorläuferkonstrukt für *pkpp2WT-hom*. Für die Konstruktion wurden drei Fragmente in den *HindIII/SalI*-geschnittenen *pTZ19R* ligiert: a) der 5'-Bereich von *kpp2* als ein 1,3 kb *HindIII/BglII*-Fragment aus *pkpp2H*; b) der 3'-Bereich des *kpp2*-ORFs als ein 0,6 kb *BglII/NotI*-Fragment aus *p123kpp2*; c) der *mfa2*-Terminator als ein 0,4 kb *NotI/BamHI*-Fragment aus *pGE101*.

#### **pkpp2AEF-hom-I**

Dieses Plasmid ist ein Vorläufer von *pkpp2AEF-hom*. Es unterscheidet sich von *pkpp2WT-hom-I* nur in den AEF-Mutationen, die durch die Verwendung des 0,6 kb *BglII/NotI*-Fragment aus *p123AEF* eingeführt wurden.

#### **pkpp2K50R-hom-I**

Dieses Plasmid ist ein Vorläufer von *pkpp2K50R-hom* und ging aus *pkpp2WT-hom-I* hervor, in dem ein internes 0,6 kb *NsiI/MluI*-Fragment mit einem entsprechenden *NsiI/MluI*-Fragment, das die K50R-Mutationen trägt, ersetzt wurde. Die K50R-Mutationen T147C, A148C und A149G generieren eine *BspEI*-Schnittstelle und wurden mittels direkter PCR-Mutagenese mit den Oligonukleotiden *kpp2K50R-I*, *kpp2K50R-II* und *kpp2K50R-III* hergestellt.

#### **pkpp2-GFP-hom-I**

Dieses Plasmid ist ein Vorläufer von *pkpp2-GFP-hom* und ging aus *pkpp2WT-hom-I* hervor, in dem ein 0,6 kb *BglII/NotI*-Fragment, das den 3'-Bereich des *kpp2*-ORFs umfasst, mit zwei Fragmenten ersetzt wurde: a) den 3'-Bereich des *kpp2*-ORFs, der an an Position +1053 eine *NcoI* enthält und mittels PCR mit den Oligonukleotiden *kpp2+379*

und *kpp2C'NcoI* hergestellt wurde, als 0,6 kb *BglII/NcoI*-Fragment; b) das *GFP*-Gen aus *p123* als 0,7 kb *NcoI/NotI*-Fragment.

### **Plasmide für homologe Rekombination in *U. maydis***

#### **pkpp2WT-hom**

Dieses Plasmid dient im endogenen *kpp2*-Locus der Expression von *kpp2* unter der Kontrolle des nativen Promotors und des *mfa2*-Terminators. Für die Konstruktion wurden vier Fragmente eingesetzt: a) den Vektor *pTZ19R HindIII/SalI* geschnitten; b) ein 2,5 kb *HindIII/BamHI*-Fragment aus *pkpp2WT-hom-I*, das 1,1 kb 5'-Bereich von *kpp2*, den-ORF von *kpp2* und den *mfa2*-Terminator enthält; c) ein 1,4 kb *BamHI/MunI*-Fragment aus *pNEB-Nat(+)*, das die Nourseothricin-Resistenzkassette beinhaltet; d) ein 1,1 kb *EcoRI/XhoI*-Fragment aus *pkpp2H*, das den 5'-Bereich von *kpp2* abdeckt.

#### **pkpp2AEF-hom**

Dieses Plasmid dient im endogenen *kpp2*-Locus der Expression von *kpp2AEF* unter der Kontrolle des nativen Promotors und des *mfa2*-Terminators und unterscheidet sich von *pkpp2WT-hom* nur in den AEF-Mutationen. Daher wurde für die Konstruktion statt aus *pkpp2WT-hom-I* ein 2,5 kb *HindIII/BamHI*-Fragment aus *pkpp2AEF-hom-I*, das 1,1 kb 5'-Bereich von *kpp2*, den-ORF von *kpp2AEF* und den *mfa2*-Terminator enthält, eingesetzt.

#### **pkpp2K50R-hom**

Dieses Plasmid dient im endogenen *kpp2*-Locus der Expression von *kpp2K50R* unter der Kontrolle des nativen Promotors und des *mfa2*-Terminators und unterscheidet sich von *pkpp2WT-hom* nur in den K50R-Mutationen. Daher wurde für die Konstruktion statt aus *pkpp2WT-hom-I* ein 2,5 kb *HindIII/BamHI*-Fragment aus *pkpp2K50R-hom-I*, das 1,1 kb 5'-Bereich von *kpp2*, den-ORF von *kpp2K50R* und den *mfa2*-Terminator enthält, eingesetzt.

#### **pkpp2-GFP-hom**

Dieses Plasmid dient im endogenen *kpp2*-Locus der Expression eines *Kpp2-GFP* Fusionsproteins unter der Kontrolle des nativen Promotors und des *mfa2*-Terminators. Für die Konstruktion wurden vier Fragmente eingesetzt: a) ein 5,7 kb *NotI/SalI*-Fragment von *pkpp2-GFP-hom-I*, das den *pTZ19R* Vektor, 1,1 kb 5'-Bereich von *kpp2* und *kpp2-gfp*

enthält; b) ein 0,4 kb *NotI/BamHI*-Fragment von *pkpp2*-GFP-hom-I, das den *mfa2*-Terminator umfasst; c) ein 1,4 kb *BamHI/MunI*-Fragment aus *pNEB-Nat(+)*, das die Nourseothricin-Resistenzkassette beinhaltet; d) ein 1,1 kb *EcoRI/XhoI*-Fragment aus *pkpp2H*, das den 5'-Bereich von *kpp2* abdeckt.

#### **pkpp2AEF-GFP-hom**

Dieses Plasmid dient im endogenen *kpp2*-Locus der Expression eines Kpp2AEF-GFP Fusionsproteins unter der Kontrolle des nativen Promotors und des *mfa2*-Terminators. Für die Konstruktion wurde in *pkpp2AEF-hom* ein 2,7 kb *BstXI/BstXI*-Fragment durch ein 3,4 kb *BstXI/BstXI*-Fragment aus *pkpp2*-GFP-hom ersetzt.

#### **pkpp2K50R-GFP-hom**

Dieses Plasmid dient im endogenen *kpp2*-Locus der Expression eines Kpp2K50R-GFP Fusionsproteins unter der Kontrolle des nativen Promotors und des *mfa2*-Terminators. Für die Konstruktion wurde in *pkpp2K50R-hom* ein 2,7 kb *BstXI/BstXI*-Fragment durch ein 3,4 kb *BstXI/BstXI*-Fragment aus *pkpp2*-GFP-hom ersetzt.

#### **p123Kpp2-GFP**

Dieses Plasmid dient der homologen Rekombination von *P<sub>otef</sub>:kpp2-GFP* in den *ip*-Locus von *U. maydis* und damit zur Überexpression des Kpp2-GFP Fusionsproteins. Für die Konstruktion des Plasmids wurde ein 0,9 kb *BstBI/NotI*-Fragment in *p123kpp2* mit einem 1,5 kb *BstBI/NotI*-Fragment aus *pkpp2*-GFP-hom ausgetauscht.

### **Plasmide für die „Two-Hybrid“-Tests**

#### **pLexA-Kpp2**

Dieses Plasmid ist ein pLexA-Derivat und enthält ein 1,1 kb *EcoRI/NotI*-Fragment, das den gesamten *kpp2*-ORF umfasst. Damit ermöglicht dieses Plasmid die Expression der LexA-Kpp2 Fusionsproteine in *S. cerevisiae*.

#### **pB42AD-Kpp2**

Dieses Plasmid ist ein pB42AD-Derivat und enthält ein 1,1 kb *EcoRI/XhoI*-Fragment, das den gesamten *kpp2*-ORF umfasst. Damit ermöglicht dieses Plasmid die Expression der B42-Kpp2 Fusionsproteine in *S. cerevisiae*.

### **Plasmide für die Proteinexpression in *E. coli***

#### **pGEX-Kpp2K50R**

Dieses Plasmid ermöglicht die Expression eines GST-Kpp2K50R Fusionsproteins in *E. coli*.

pGEX-Kpp2K50R ist ein pGEX-Kpp2-Derivat, in dem ein 0,5 kb *NcoI/BglII*-Fragment durch ein 0,5 kb *NcoI/BglII*-Fragment aus *p123kpp2K50R* ersetzt wurde, das die K50R-Mutationen trägt.

#### **4.1.5.4 Weitere Plasmide**

#### **pRU11ras1Q67L**

Dieses Plasmid dient der homologen Rekombination von *P<sub>cr1</sub>:ras1<sub>Q67L</sub>* in den *ip*-Locus von *U. maydis* und ermöglicht damit die Expression von *ras1<sub>Q67L</sub>*. pRU11ras1Q67L ist ein pRU11-Derivat, in dem das *GFP*-Gen durch das *ras1<sub>Q67L</sub>*-Allel ersetzt wurde. Dieses Allel *ras1<sub>Q67L</sub>* wurde mittels zwei PCRs hergestellt: a) mit den Oligonukleotiden Ras1-5'-NdeI und Ras1-Q67L wurde am ATG des *ras1*-ORFs eine NdeI-Schnittstelle und mit den Q67L-Mutationen, A200T und G201C, eine XhoI-Schnittstelle eingefügt; b) mit den Oligonukleotiden RasQLXhoI und Ras1-3'-NotI wurde der Rest des *ras1*-Gens amplifiziert und am STOP eine NotI-Schnittstelle eingefügt. Beide Teile wurden im nächsten Schritt als 0,2 kb *NdeI/XhoI*- bzw. 0,6 kb *XhoI/NotI*-Fragmente isoliert und mit den 4,7 kb *BglII/NdeI* und 3,2 kb *BglII/NotI*-Fragmenten aus pRU11 ligiert.

#### **p123pra2**

Dieses Plasmid ist ein p123-Derivat und dient der homologen Rekombination von *P<sub>otef</sub>:pra2* in den *ip*-Locus von *U. maydis* und ermöglicht damit die Überexpression von *pra2*. Für die Konstruktion wurde ein 1,9 kb *HindIII/NotI*-Fragment aus JG10 (M. Feldbrügge, p. Mitteilung), das den *otef1*-Promotor und den *pra2*-ORF enthält, in den *HindIII/NotI*-geschnittenen p123 ligiert. Damit ist *pra2* unter der Kontrolle des *otef*-Promotors und des *nos*-Terminators.

#### **pubc1-1**

Dieses Plasmid dient der Deletion von *ubc1*. pubc1-1 ist ein Derivat von pubc1, in dem ein internes 1,5 kb *BssHI/BssHI*-Fragment durch ein 2,9 kb *AscI*-Fragment aus pNEB-Hyg(-) ersetzt wurde.

Dadurch wird der ORF von *ubc1* von Position +60 bp - +1551 bp deletiert.

#### **pCRadr1k.o.**

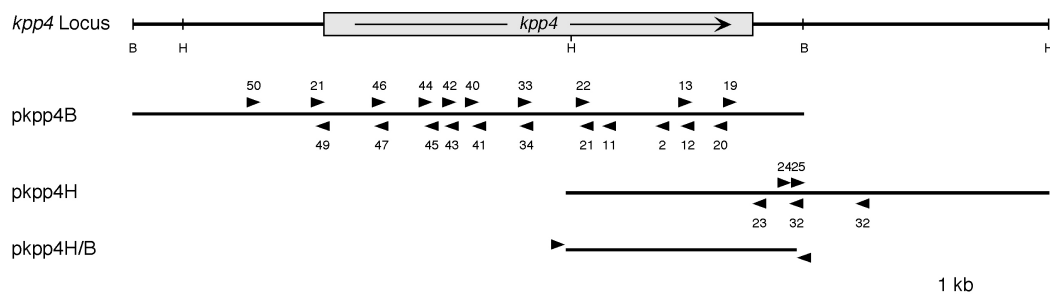
Dieses Plasmid ist ein pCR2.1-Topo-Derivat und enthält das *adr1*-Deletionskonstrukt. Für die Konstruktion wurden mit den Oligonukleotiden *adr1*-894 und *adr1*-5'SfiI sowie *adr1*+2262 und *adr1*-3'SfiI die 5' bzw. die 3'-Bereiche angrenzend an den *adr1*-ORF amplifiziert, mit *SfiI* geschnitten und mit einem 1,9 kb *SfiI*-Fragment aus pBSshn, das die Hygromycin-Resistenzkassette umfasst, ligiert und in pCR2.1-Topo eingefügt. Zur Gewinnung des PCR-Produkts mit den Oligonukleotiden *adr1*-894 und *adr1*+2262, dass für die Transformation eingesetzt werden kann, dient dieses Plasmid als Matrize für. Die Bedingungen: 1 mM dNTPs/100ng Plasmid-DNA / 50pmol Oligo-

nukleotide. Es sollte ein „Hotstart durchgeführt werden, d.h. die *Taq* sollte erst nach der ersten Denaturierungsschritt in den Reaktionsansatz zugefügt werden. Das Programm wurde wie folgt gewählt: 94°C, 10 min/ +2U *Taq* [94°C, 1 min - 66°C, 1 min - 72°C, 4 min] x 30 - 72°C, 10 min.

#### **pPRE6-GFP**

Dieses Plasmid ist ein pNEBUH-Derivat, das sechs synthetische PRE-Boxen vor einem *dik6*-basal-Promotor und einem *GFP*-Reportergen trägt. Es wurde konstruiert, indem pNEBUH mit *EcoRI* und *PacI* geöffnet wurde mit einem 0,17 kb *PacI/NcoI*-Fragment aus pUma182, das 6 PRE-Boxen und den *dik6*-basal-Promotor trägt (M. Feldbrügge persönliche Mitteilung), und einem 1,0 kb *NcoI/EcoRI*-Fragment aus p123, das das *GFP*-Gen und den *nos*-Terminator enthält, ligiert wurde.

### 4.1.6 Sequenzierungsstrategie von *kpp4*

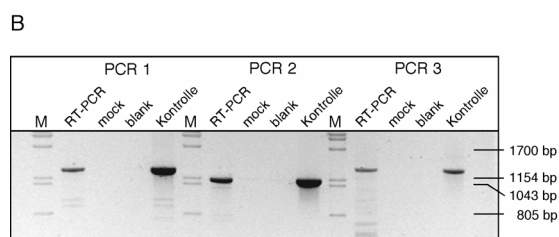
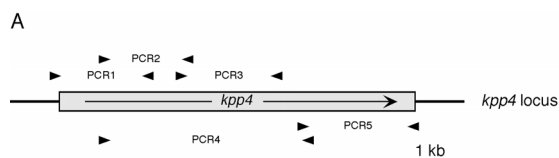


**Abbildung 37: Der *kpp4*-Locus:** Dargestellt ist die relative Lage der Subklone *pkpp4B*, *pkpp4H* und *pkpp4H/B*. Verwendete Oligonukleotide: die Nummern beziehen sich auf OPM-Oligonukleotide. Der Subklon *pkpp4H/B* wurde mit den Oligonukleotiden SP6-24 und T7-24 sequenziert. Restriktionsenzyme: B, *Bam*HI; H, *Hind*III. Die Abb. ist maßstabsgerecht.

### 4.1.7 Isolierung der *kpp4*-cDNA-Fragmente

Für die Isolierung von partiellen *kpp4* cDNA-Fragmenten wurde mir freundlicherweise von G. Weinzierl mRNA aus dem *U. maydis*-Stamm AB33 zu Verfügung gestellt. Mit dieser mRNA wurden drei Reaktionen angesetzt, *RT-PCR* (mit mRNA und Reverse-Transkriptase), *mock* (mit mRNA, ohne Reverse-Transkriptase) und *blank* (ohne mRNA, mit Reverse-Transskriptase):

Die Reaktionsansätze sahen wie folgt aus, in den Ansätzen *blank* und *mock* wurde dann aber entsprechende



**Abbildung 38: Isolierung von *kpp4*-cDNA-Fragmenten.** A) Lage der in die fünf PCRs eingesetzten Oligonukleotide. B) Exemplarisch sind alle vier Ansätze von PCR1, PCR2 und PCR3 dargestellt. Die Kontrollansätze wurden mit genomischer *U. maydis*-DNA als Matrize vorgenommen. Details siehe Text. M: DNA-Größenmarker,  $\lambda$ -DNA *Pst*I verdaut.

Volumina an  $H_2O$  zugegeben:

3  $\mu$ l mRNA aus AB33

1  $\mu$ l Poly - (dT)<sub>18</sub> - Oligonukleotid (100 pmol)

1  $\mu$ l RNase Inhibitor (Roche)

Diesen Ansatz für 2 min bei 70°C inkubieren, auf Eis abkühlen lassen und für 5 min auf 42°C stellen. Darauf Zugabe von:

2  $\mu$ l 2,5x First-Strand-Buffer (Gibco)

1  $\mu$ l 20 mM DTT

1  $\mu$ l 10 mM dNTPs

1  $\mu$ l *Reverse Transskriptase* (Gibco)

Diesen Ansatz für 90 min bei 42°C, 15 min bei 50°C und 10 min bei 70°C inkubieren.

2  $\mu$ l dieser Ansätze wurde in 5 verschiedene PCR-Reaktion mit den Oligonukleotid-Kombinationen, *kpp4*-550 / OPM45 (PCR1); OPM46 / OPM41 (PCR2); OPM40 / OPM21 (PCR3); OPM46 / *kpp4*

(cDNA)rev2 (PCR4); *kpp4*+974 / *kpp4*+1490 (PCR5), deren relative Lage zum *kpp4*-Orf1 in Abb. 38 abgebildet sind. PCR-Bedingungen: 94°C/4 min - 2UTaq-94°C/1 min - [94°C/1 min - 65°C/1 min - 72°C/2 min] x 30 - 72°C/5 min. Die klonierten PCR-Produkte wurden sequenziert und zeigten keine Abweichung zu der genomischen Sequenz.

## 4.2 Mikrobiologische, zellbiologische und genetische Methode

### 4.2.1 *Escherichia coli*

#### 4.2.1.1 Kultivierung von *E. coli*

*E. coli*-Stämme wurden entweder als Schüttelkulturen bei 200 Upm oder auf Festmedien unter aeroben Bedingungen bei 37°C kultiviert. Übernachtskulturen wurden von YT-Amp Festmedien angeimpft. Die bei -80°C gelagerten Glycerinkulturen wurden vor weiteren Arbeiten immer zuerst auf YT-Amp Festmedien ausgestrichen.

#### 4.2.1.2 Bestimmung der Zelldichte bei *E. coli*

Die Zelldichte von Flüssigkulturen wurde photometrisch in einem Novospec II Photometer (Pharmacia Biotech) bei 600 nm bestimmt. Um eine lineare Abhängigkeit sicherzustellen, wurden für die Messung der OD<sub>600</sub> die Kulturen durch entsprechende Verdünnung auf einen Wert unterhalb von 0,8 verdünnt. Als Nullwert wurde die OD<sub>600</sub> des jeweiligen Kulturmediums verwendet. OD<sub>600</sub> = 1,0 entspricht etwa 10<sup>9</sup> Zellen/ml.

#### 4.2.1.3 RbCl-Transformation von *E. coli*

Dieses Protokoll ist modifiziert nach (Cohen *et al.*, 1972). Zur Herstellung Transformations-kompetenter Bakterienzellen wurden 100 ml LB-Medium, dem je 10 mM MgCl<sub>2</sub> und MgSO<sub>4</sub> zugesetzt war, mit 1 ml einer frischen DH5 $\alpha$ -Übernachtskultur angeimpft und bis zu einer OD<sub>600</sub>  $\approx$  0,5 bei 37°C und 200 Upm inkubiert. Die Zellen wurden durch Zentrifugieren für 15 min bei 3.000 Upm und 4°C (Heraeus Varifuge 3.0R) pelletiert und in 33 ml eiskalter RF1-Lösung resuspendiert. Nach 30 bis 60 min Inkubation auf Eis wurden die Zellen erneut abzentrifugiert (15 min, 3.000 Upm, 4°C, Heraeus Varifuge 3.0R), der Überstand abgenommen, die Zellen in 5 ml eiskalter RF2-Lösung resuspendiert und 15 min inkubiert. Die Zellsuspension wurde zu je 100  $\mu$ l aliquotiert, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80°C gelagert.

Zur Transformation wurden die Zellen auf Eis aufgetaut, jeweils 50  $\mu$ l mit 10  $\mu$ l Plasmidlösung (1-5 ng Plasmid) bzw. Ligationsansatz versetzt und 15 min auf Eis inkubiert. Nach einem Hitzeschock von 2 min bei 42°C wurde der Transformations-Ansatz zur phänotypischen Expression der durch das eingebrachte Plasmid vermittelten Antibiotika-resistenz mit 800  $\mu$ l dYT-Medium versetzt und 30 min bei 500 Upm und 37°C in einem Eppendorf-Wärmeblock inkubiert. 200  $\mu$ l des Transformations-Ansatzes wurde auf YT-Platten mit 100  $\mu$ g/ml Ampicillin ausplattiert und über Nacht bei 37°C inkubiert. Auf diese Weise konnte eine Transformationsrate von 10<sup>6</sup> Transformanten pro 1  $\mu$ g eingesetzter Plasmid-DNA erreicht werden.

##### RF1-Lösung

100 mM RbCl  
50 mM MnCl<sub>2</sub> x 4 H<sub>2</sub>O  
30 mM K-Acetate  
10 mM CaCl<sub>2</sub> x 2 H<sub>2</sub>O  
15 % (v/v) Glycerin  
mit Essigsäure auf pH 5,8 einstellen und sterilfiltrieren

##### RF2-Lösung

10 mM MOPS  
10 mM RbCl  
75 mM CaCl<sub>2</sub> x 2 H<sub>2</sub>O  
15 % (v/v) Glycerin

mit NaOH auf pH 5,8 einstellen und sterilfiltrieren

#### 4.2.2 *Saccharomyces cerevisiae*

##### 4.2.2.1 Kultivierung von *S. cerevisiae*

*S. cerevisiae*-Stämme wurden entweder als Schüttelkulturen bei 200 Upm oder auf Festmedien unter aeroben Bedingungen bei 28°C kultiviert, sofern nicht anders vermerkt. Übernachtskulturen wurden von Kulturen auf Festmedien, die weniger als einen Monat bei 4°C gelagert wurden, angeimpft. Die bei -80°C gelagerten Glycerinkulturen wurden vor weiteren Arbeiten immer zuerst auf Festmedien ausgestrichen.

##### 4.2.2.2 Bestimmung der Zelldichte bei *S. cerevisiae*

Die Zelldichte von Flüssigkulturen wurde photometrisch in einem Novospec II Photometer (Pharmacia Biotech) bei 600 nm bestimmt. Um eine lineare Abhängigkeit sicherzustellen, wurden für die Messung der OD<sub>600</sub> die Kulturen durch entsprechende Verdünnung auf einen Wert unterhalb von 0,8 verdünnt. Als Nullwert wurde die OD<sub>600</sub> des jeweiligen Kulturmediums verwendet. OD<sub>600</sub> = 1,0 entspricht etwa 1-5 x 10<sup>7</sup> Zellen/ml.

##### 4.2.2.3 Transformation von *S. cerevisiae*

Dieses Protokoll ist geringfügig modifiziert nach Sherman *et al.*, (1996). Von einem Verdünnungsausstrich auf YEPD-Platten/Selektionsplatten ausgehend, wurden 20 ml YEPD/Selektions-Medium inokuliert und über Nacht bei 28°C und 200 Upm inkubiert. Die Vorkultur wurde 1:50 in 200 ml YEPD-Medium verdünnt und bei 28°C und 200 Upm inkubiert bis OD<sub>600</sub> = 0,6 erreicht war. Um die Zellen zu ernten, wurde die Kultur auf 50 ml Greiner-Röhrchen verteilt und bei 3000 Upm in einer Heraeus-Zentrifuge bei RT pelletiert. Die Zellen wurden mit 10 ml H<sub>2</sub>O<sub>bid</sub> gewaschen, anschließend in einer frisch hergestellten Lithiumacetat/TE-Lösung aufgenommen und darin nochmals gewaschen. Die pelletierten Zellen werden daraufhin in 500  $\mu$ l Lithiumacetat/TE-Lösung aufgenommen und zu 50  $\mu$ l



aliquotiert. Es wurde zu den Aliquots 10 µl Herings/Lachs-Sperma-DNA und 0,1-1 µg Plasmid-DNA (Transformation von zwei Plasmiden gleichzeitig möglich) zugegeben, kräftig gemischt und 5-7 Minuten bei 30°C unter Schütteln inkubiert. Danach werden die Suspensionen mit 300 µl Lithiumacetat/PEG versetzt und für 30 Minuten bei 30°C unter Schütteln inkubiert, ehe für 15 Minuten bei 42°C ein Hitzeschock folgt. Die Zellen wurden dann direkt auf die entsprechenden Selektionsplatten ausgestrichen.

#### **Lithiumacetat/TE**

100 mM Lithiumacetat  
sterilfiltriert

#### **Lithiumacetat/PEG**

100 mM Lithiumacetat  
40 % PEG4000  
sterilfiltriert

#### **Herings/Lachs-Sperma-DNA**

10 mg/ml Herings/Lachs-Sperma-DNA  
in TE-Puffer, ultrabeschallt und gekocht

### **4.2.2.4 lacZ-Filtertest von *S. cerevisiae***

Dieses Protokoll ist geringfügig verändert nach Sherman *et al.*, (1996). X-Gal (5-Chlor-4-Brom-3-indolyl-β-D-galaktosid) ist ein Substratanalogon für β-Galaktosidase, die vom *lacZ*-Gen kodiert wird. Das Enzym hydrolysiert das Zuckerderivat und durch Luftoxidation entsteht als Reaktionsprodukt ein schwer löslicher, blauer Indigofarbstoff. Um die bei einer Transformation erhaltenen Hefe-Transformanten auf β-Galaktosidaseaktivität testen zu können, wurden die Kolonien von einer Transformationsplatte auf entsprechende Selektions-Platten ausgestrichen und für 48-72 Stunden bei 28°C inkubiert. Als Kohlenstoffquelle dient Raffinose, um das bekannte Phänomen der Repression der β-Galaktosidase Expression durch Glukose zu vermeiden. Die Hefezellen wurden durch das Auflegen eines Nitrocellulose-Filters (Schleicher & Schüll BA 85) auf diesen transferiert, für etwa 1 Minute in flüssigem Stickstoff tiefgefroren und anschließend auf einem Papierfilter (Schleicher & Schüll 595), der mit 1,5 ml Z-Puffer/X-Gal getränkt war, im Deckel einer Petrischale aufgetaut. Die Petrischalen werden eingedeckelt und mit Parafilm

verschlossen. Die Filter werden für 2-48 Stunden bei 37°C inkubiert. Auch nach 4-tägiger Inkubation bei 37°C ließ sich bei Transformanten, die keine β-Galaktosidaseaktivität besitzen, keine β-Galaktosidaseaktivität im *lacZ*-Filtertest nachweisen.

#### **X-Gal-Lösung**

2 % X-Gal in Dimethylformamid lösen.

#### **Z-Puffer**

100 mM NaPO<sub>4</sub> pH 7.0  
1 mM MgSO<sub>4</sub>  
10 mM KCl

#### **Z-Puffer/X-Gal**

Z-Puffer, frisch zugeben:  
5 µl/ml 10 % SDS  
3,5 µl/ml 2 % X-Gal-Lösung

### **4.2.2.5 LacZ-Flüssigtest von *S. cerevisiae***

Dieses Protokoll ist geringfügig verändert nach Miller (1972). Die zu testenden Transformanten wurden in Selektionsflüssigmedium bis zu einer OD<sub>600</sub> ≈ 1,0 angezogen, die optische Dichte der Kultur gemessen und die Proben in jeweils zwei Aliquots je 0,5 ml geteilt. Diese Proben werden mit 0,5 ml Z-Puffer/SDS gemischt und es werden 50 µl Chloroform zugegeben. Die Proben werden dann kurz gevortext und für 30 min bei 37°C vorinkubiert. Zum Zeitpunkt 0 Start werden den Reaktionsansätzen 200 µl ONPG-Lösung zugegeben. Sobald eine Gelbfärbung einer Probe eintritt, kann die Reaktion gestoppt werden. Dazu werden 0,5 ml 1M Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> zugegeben, gemischt und der Zeitpunkt bestimmt. Die Zelltrümmer werden dann pelletiert (3.500 Upm, 5 min, RT, Heraeus Biofuge 15) und die optische Dichte des Überstands wird bei 420 nm bestimmt. Die Menge an β-Galactosidase-Aktivität in Miller-Units ergibt sich dann aus folgender Formel:

$$\text{MillerUnits} = \frac{1000 \times \text{OD}_{420}}{t(\text{min}) \times 0,5 \times \text{OD}_{600}}$$

#### **ONPG-Lösung**

0,1 M NaPO<sub>4</sub> pH 7,0  
4 mg/ml ONPG

#### **Z-Puffer/SDS**

Z-Puffer, frisch zugeben:  
1 % SDS und  
50 mM β-Mercaptoethanol

**Ergebnisse des Two-Hybrid-Tests aus 2.2.4 in Miller-Units:**

	pLexA	-Kpp4KD	-Kpp2	-Kpp6
pB42AD	20,2 ± 5,3	4,2 ± 1,4	6,6 ± 0,6	4,2 ± 1,8
-Kpp4KD	12,8 ± 3,2	4,9 ± 2,2	11,5 ± 0,8	10,5 ± 12,
-Kpp4RD	6,3 ± 3,5	32,7 ± 11,4	109,5 ± 28,7	732,3 ± 119,2
-Kpp4	16,1 ± 6,7	7,2 ± 3,8	302,6 ± 31,5	415,6 ± 187,2
-Kpp2	8,1 ± 1,3	5,6 ± 3,3	312,2 ± 47,3	100,6 ± 12,2
-Fuz7	14,8 ± 4,7	7,3 ± 2,2	17,1 ± 5,5	4,8 ± 1,9

**4.2.3 *Ustilago maydis*****4.2.3.1 Kultivierung von *U. maydis***

*U. maydis*-Stämme wurden entweder als Schüttelkulturen bei 200 Upm oder auf Festmedien unter aeroben Bedingungen bei 28°C kultiviert, sofern nicht anders vermerkt. Übernachtskulturen wurden von Kulturen auf Festmedien, die weniger als einen Monat bei 4°C gelagert wurden, angeimpft. Die bei -80°C gelagerten Glycerinkulturen wurden vor weiteren Arbeiten immer zuerst auf Festmedien ausgestrichen.

**4.2.3.2 Bestimmung der Zelldichte bei *U. maydis***

Die Zelldichte von Flüssigkulturen wurde photometrisch in einem Novospec II Photometer (Pharmacia Biotech) bei 600 nm bestimmt. Um eine lineare Abhängigkeit sicherzustellen, wurden für die Messung der OD<sub>600</sub> die Kulturen durch entsprechende Verdünnung auf einen Wert unterhalb von 0,8 verdünnt. Als Nullwert wurde die OD<sub>600</sub> des jeweiligen Kulturmediums verwendet. OD<sub>600</sub> = 1,0 entspricht etwa 1-5 x 10<sup>7</sup> Zellen/ml.

**4.2.3.3 Induktion des *crg1*-Promotors**

Die Stämme wurden aus Vorkultur in CM-Flüssigmedium angeimpft, das Glucose als einzige Kohlenstoffquelle enthielt, um reprimierende Bedingungen zu gewährleisten, und bis zu

OD<sub>600</sub> ≈ 0,6 bei 28°C und 200 Upm inkubiert. Die Zellen wurden daraufhin abzentrifugiert (3.500 Upm, 5 min, RT, Heraeus Varifuge 3.0R), der Überstand abgenommen und die Zellen im gleichen Volumen H<sub>2</sub>O<sub>bid.</sub> resuspendiert. Nach nochmaliger Pelletierung (3.500 Upm, 5 min, RT, Heraeus Varifuge 3.0R) wurden die Zellen in CM-Flüssigmedium resuspendiert, das Arabinose als einzige Kohlenstoffquelle enthielt, um den *crg1*-Promotor zu induzieren. Die Kulturen wurden bei 28°C und 200 Upm für die gewünschte Zeit geschüttelt.

**4.2.3.4 Transformation von *U. maydis***

Dieses Protokoll ist modifiziert nach Schulz *et al.* (1990) und Gillissen *et al.* (1992). Von einer auf Platte wachsenden Kultur wurde 50 ml frischem YEPS-Flüssigkultur angesetzt und bei 28°C bis zu einer Zelldichte von 1-2 x 10<sup>7</sup> Zellen/ml (bis maximal OD<sub>600</sub> = 1,0) geschüttelt. Nach Erreichen des optimalen Zelltiters wurden die Zellen durch Zentrifugieren (3.500Upm, 10 min, 4°C, Heraeus Varifuge 3.0R) geerntet, einmal mit 25 ml SCS gewaschen und in 2 ml SCS mit 2,5 mg/ml Novozym resuspendiert. Die in diesem Puffer bei Raumtemperatur ablaufende Protoplastierung kann mikroskopisch verfolgt werden, da die zigarrenförmigen Zellen nach Lyse der Zellwand eine kugelige Form einnehmen. Nach vollständiger Protoplastierung (5-15 min) wurden 20 ml SCS zugegeben und die Protoplasten durch 10 minütige Zentrifugation bei 2.300 Upm (4°C, Heraeus Varifuge 3.0R) pelletiert. Um das Novozym vollständig zu entfernen, wurde dieser Waschgang dreimal wiederholt. Anschließend wurde mit 20 ml STC gewaschen und das Pellet danach in einem Volumen von 0,5 ml eiskaltem STC aufgenommen. Die so behandelten Protoplasten können 3 - 4 h auf Eis oder aliquotiert bei -80°C mehrere Monate aufbewahrt werden.

Zur integrativen Transformation wurden 50 µl Protoplasten mit ca. 5 µg maximal aber 10 µl linearisierter Plasmid-DNA oder PCR-Produkt und 1 µl Heparin-Lösung für 10 min auf Eis inkubiert. Für eine Transformation mit freireplizierenden Plasmiden werden 50 µl Protoplasten mit 1 µg zirkulärer Plasmid-DNA und 1 µl Heparin-Lösung für 10 min auf Eis inkubiert. Nach Zugabe von 0,5 ml STC/PEG folgte eine weitere Inkubation von 15 min auf Eis. Anschließend wurde der gesamte

Transformationsansatz auf einer kurz zuvor mit Top-Agar überschichteten Regenerationsagarplatte ausgestrichen. Nach 2 bis 8 Tagen Inkubation bei 28°C wurden die gewachsenen Kolonien mit Zahnstochern auf Antibiotikum-haltigen PD-Platten, vereinzelt. Potentielle Transformanten wurden mittels Ganz-Zell-PCR vorselektiert und abschließend durch Southern-Blot Analyse verifiziert. Die Stämme wurden im Allgemeinen insgesamt dreimal vereinzelt.

#### SCS

20 mM Na-Citrat, pH 5,8  
1 M Sorbitol  
sterilfiltriert

#### STC

10 mM Tris-Cl, pH 7,5  
100 mM CaCl<sub>2</sub>  
1 M Sorbitol  
sterilfiltriert

#### STC/PEG

10 g PEG4000 in 15 ml STC

### 4.2.3.5 Test auf Paarungskompetenz und filamentöses Wachstum

*U. maydis*-Stämme wurden von Platte in CM-Glucose Flüssigmedium inokuliert. Bei 28°C wurden die Zellen bis zu einer OD<sub>600</sub> von 0,5-1,0 inkubiert. Die Zellen wurden geerntet (Zentrifugieren bei 3.500 Upm für 5 min bei RT in der Heraeus Varifuge 3.0R) und das Pellet anschließend in H<sub>2</sub>O<sub>bid.</sub> so aufgenommen, dass die Zelldichte bei etwa OD<sub>600</sub> = 5,0 lag. Bei Kreuzungen wurde gleiche Volumina der jeweiligen Kreuzungspartner in einem Eppendorf-Gefäß miteinander gemischt. Von diesen Ansätzen wurden 3 µl auf eine PD-Charcoal-Platte getropft. Die Platte wurde für 48 h bei 22°C unter Luftabschluss inkubiert.

### 4.2.3.6 Pheromonstimulation in Flüssigkultur

Die zu testenden Stämme wurden im CM-1 %-Glukose-Flüssigmedium bei 28°C mit 200 Upm bis

zu einer Dichte von OD<sub>600</sub> ≈ 0,8 geschüttelt. Jeweils 1 ml Kultur wurde in 15 ml PPN Zentrifugenröhrchen (Greiner) pelletiert (3.000 Upm, 5 min, RT, Heraeus Varifuge 3.0R) und der Überstand abgenommen. Die Pellets wurden in 1 ml CM-1 %-Glukose-Flüssigmedium, dem zuvor kompatibles Pheromon in DMSO in einer Endkonzentration von 2,5 µg/ml oder nur DMSO zugesetzt worden war, resuspendiert. Die Zellen wurden anschließend in den PPN-Röhrchen auf einem Roll-Inkubator (New Brunswick Scientific) bei ca. 20 Upm in nahezu waagrechter Position gedreht. Nach verschiedenen Zeitpunkten wurde die Bildung von Konjugationshyphen mikroskopisch analysiert.

### 4.2.3.7 Test auf Pathogenität

Der verwendete Pathogenitätstests ist eine Spritzinfektion, bei der 200 - 250 µl einer Pilzsuspension (in Wasser, OD<sub>600</sub> = 3) in das Innere des Blattwirtels von 7 Tage alten Maispflanzen der Sorte Golden Bantam gespritzt werden. Die Stämme wurden vorher über Nacht in YEPS-Flüssigkultur zu einer OD<sub>600</sub> = 0,8 angezogen. Nach Erreichen des optimalen Zelltiters wurden die Zellen durch Zentrifugieren (3.500Upm, 10 min, 4°C, Heraeus Varifuge 3.0R) geerntet und in Wasser zu einer OD<sub>600</sub> = 3 aufgenommen. Bei Mischungen wurden die entsprechenden Suspensionen vorher 1:1 gemischt. Etwa 14 Tage nach Infektion wurden die entstandenen Tumore lichtmikroskopisch auf Sporenbildung untersucht.

### 4.2.3.8 Sporulation und Segregationsanalyse

Von den infizierten Pflanzen wurden Tumore abgeschnitten und etwa eine Woche bei 37°C getrocknet. Die aus den Tumoren präparierten Sporen wurden 15 min in einer 1,5 %-igen CuSO<sub>4</sub>-Lösung inkubiert, um eventuell noch vorhandene Sporidien abzutöten und anschließend mit H<sub>2</sub>O<sub>bid.</sub> gewaschen. Verdünnungen dieser Sporensuspension wurden auf YEPS<sub>L</sub>-Platten ausplattiert. Die aus einer Spore auswachsenden Sporidien wurden zweimal vereinzelt und der Genotyp durch Testkreuzungen mit den Stämmen FB1 (*a1 b1*), FB2 (*a2 b2*), FB6b (*a1 b2*) und FB6a (*a2 b1*) bestimmt.

#### 4.2.3.9 Test auf filamentöses Wachstum auf der Maispflanze

Zur Untersuchung des filamentösen Wachstums auf der Maispflanze und der Ausbildung von Infektionsstrukturen wurden Maispflanzen mittels Spritzinfektion infiziert. Nach 12, 24 und 48 h wurde dann ein Stück von der Blattspreite des dritten Blatts, das unterhalb der Durchstichstelle lag, ausgeschnitten und mit einer Rasierklinge in kleine Stücke geschnitten. Die Blattstücke wurden 1 min in eine FungiFluor™-Färbelösung (Sigma) gelegt. Die Präparate wurden anschließend in einem Tropfen Wasser unter UV-Licht im Fluoreszenz-Mikroskop (Axiophot, ZEISS) untersucht. Zur mikroskopischen Beobachtung von *U. maydis*-Zellen während des biotrophen Wachstums wurden 0,5 cm<sup>2</sup> große Quadrate aus Maisblättern 1, 2, 4 und 6 Tage nach der Infektion unweit der Infektionsstelle entnommen. Anschließend wurden mit einer Rasierklinge Querschnitte des entnommenen Blattstückes angefertigt und für die Analyse Stellen ausgewählt, die etwa 3 bis 6 Zellschichten dick waren.

#### 4.2.3.10 Mikroskopie und Bildverarbeitung

Die zellmorphologische Betrachtung von *U. maydis* erfolgte an einem Lichtmikroskop (Axiophot, ZEISS) mittels Nomarski- oder DIC-Optik und Fluoreszenz-Mikroskopie. 8 µl der entsprechenden Kultur bzw. des fixierten Präparats wurden zur Analyse auf Objektträger getropft, mit 8 µl einer 2 % wässrigen Lösung von Low-Melting-Agarose (37°C; Sigma) vermischt, und mit einem Deckgläschen bedeckt. Für die Fluoreszenz-Mikroskopie wurden Filter mit folgendem Anregungs- und Emissionsspektrum eingesetzt: DAPI-Färbung, 365 nm und >397 nm; GFP 450-490 nm und 515-565 nm, WGA-TRITC 546 nm und 590 nm. Digitale Aufnahmen mit einer hochauflösenden CCD-Kamera (C4742-25, Hamamatsu) wurden mit dem Programm IMAGE PRO PLUS (Media Cybernetics) nachbearbeitet (Bildausschnitt, Kontrastverstärkung, Maßstabskalierung) und als TIFF-Dateien für die weitere Bearbeitung in den Programmen PHOTOSHOP 6.0 (Adobe) und CANVAS 7.0 (Deneba) abgespeichert.

#### 4.2.3.11 Fixierung von Zellen

Zellen wurden durch Zugabe von 10 %-iger Formaldehyd-Lösung bis zu einer Endkonzentration von 1 % direkt zum Medium fixiert. Nach 30 min Inkubation auf einem Drehrad (Eppendorf) wurden die Zellen pelletiert (3.500 Upm, 5 min, RT, Heraeus Biofuge 15), zweimal mit PBS gewaschen, in PBS aufgenommen und bis zur weiteren Bearbeitung bei 4°C gelagert. Filamentöse Zellen erforderten zur Pelletierung längere Zentrifugation.

#### 4.2.3.12 WGA-Färbung

Etwa 500 µl fixierte Zellen in PBS wurden mit 5 µl einer WGA-TRITC Stammlösung (Sigma, 2 mg/ml) versetzt und 15 min auf einem Drehrad inkubiert. Anschließend wurden die Zellen zweimal mit PBS gewaschen (3.500 Upm, 5 min, RT, Heraeus Biofuge 15) und in PBS aufgenommen und weiterverarbeitet.

#### 4.2.3.13 DAPI-Färbung

Etwa 500 µl fixierte Zellen in PBS wurden pelletiert (3.000 Upm, 5 min, RT, Heraeus Biofuge 15) und in 200 µl H<sub>2</sub>O<sub>bid.</sub> aufgenommen. Diese Zellsuspension wurde auf ein mit Polylysin beschichtetes Deckglas gegeben und 10 min bei RT inkubiert. Anschließend wurde das Deckglas mit den Zellen nach unten für kurze Zeit in eine Petrischale mit PBS gelegt (Waschschritt). Das Deckglas wurde abgetropft, so dass ca. 10 µl am Deckglas verblieben. 10 µl einer DAPI-Lösung (Sigma D-9542, 1 mg/ml in PBS +50 % Glycerin) wurden in eine Petrischale mit 10 ml PBS gegeben, das Deckglas mit den Zellen nach unten auf die Flüssigkeit gelegt und so für 10 min bei 60°C inkubiert. Nach einem weiteren Waschschritt (10 min in PBS) wurde das Deckglas abgetropft und auf einen Objektträger gelegt. Das Präparat wurde mit VALAP versiegelt und im Dunkeln bei 4°C aufbewahrt.

#### VALAP

- 33 % (w/w) Vaseline
- 33 % (w/w) Lanolin
- 33 % (w/w) Paraffin

## 4.3 Molekularbiologische Standardmethoden

Standardtechniken, wie z.B. Aufreinigung, Fällung, Restriktion und elektrophoretische Auftrennung von DNA, oder Klonierungstechniken sind in Ausubel *et al.* (1987) und Sambrook *et al.* (1989) ausführlich beschrieben. Die Konzentration von Nukleinsäuren wurde photometrisch bestimmt. Bei einer Schichtdicke von 1 cm entspricht  $OD_{260} = 1$  einer Konzentration von 50 µg/ml doppelsträngiger DNA, 33 µg/ml einzelsträngiger DNA, bzw. 40 µg/ml RNA.

Als Maß für die Reinheit der Desoxyribonukleinsäuren diente der Quotient aus  $OD_{260}$  zu  $OD_{280}$ . Für reine DNA und RNA sollte er bei etwa 1,8 bzw. 1,9 liegen. Niedrigere Werte weisen auf Verunreinigungen mit Proteinen hin, höhere Werte auf Verunreinigungen mit Salzen oder Zuckern. Die Messungen erfolgten in einem Lambda Bio UV-Spektralphotometer (Perkin Elmer).

### 4.3.1 Isolierung von Nukleinsäuren

#### 4.3.1.1 Präparation von Plasmid-DNA aus *E. coli*

Die Isolierung erfolgte durch "Lyse durch Kochen" nach Sambrook *et al.* (1989). 1,5 ml einer *E. coli* Übernachtskultur wurden pelletiert (14.000 Upm, 30 sec, RT, Heraeus Biofuge 15). Das Zellpellet wurde in 300 µl STET resuspendiert, nach Zugabe von 20 µl Lysozym-Lösung kräftig geschüttelt und anschließend 40 sec bei 95°C in einem Eppendorf-Heizblock inkubiert. Die lysierten Zellen und die denaturierte genomische DNA wurden 15 min bei 14.000 Upm abzentrifugiert (Heraeus Biofuge 15) und danach mit einem sterilen Zahnstocher aus der wässrigen Lösung entfernt. Die Reinigung der Plasmid-DNA erfolgte durch Fällung mit 40 µl 3 M Na-Acetat, pH 5,3 und 400 µl Isopropanol bei RT für 5 min und anschließender Zentrifugation für 5 min bei 14.000 Upm (Heraeus Biofuge 15). Das Pellet wurde mit 70 % Ethanol gewaschen und nach Trocknen in 100 µl TE-Puffer mit 20 µg/ml RNase A aufgenommen, bei 55°C resuspendiert bei -20°C aufbewahrt. Mit dieser Methode gelang es routine-

mäßig, aus 1,5 ml Übernachtskultur etwa 50 µg Plasmid-DNA zu isolieren.

#### STET

50 mM Tris-Cl, pH 8,0  
50 mM Na<sub>2</sub>-EDTA  
8 % (w/v) Saccharose  
5 % (v/v) Triton X-100

#### Lysozym-Lösung

10 mg/ml Lysozym  
10 mM Tris-Cl, pH 8,0

#### 4.3.1.2 DNA-Isolierung aus *U. maydis*

Diese Methode ist modifiziert nach Hoffman und Winston (1987). Dabei wurden 1,5 ml einer Übernachtskultur in YEPS<sub>L</sub>-Flüssigmedium wurden zusammen mit 0,3 g Glasperlen in einem 2 ml Eppendorf-Reaktionsgefäß pelletiert (14.000 Upm, 30 sec, RT, Heraeus Biofuge 15), der Überstand abgegossen und das Pellet in 400 µl *Ustilago*-Lysispuffer und 400 µl TE-Phenol/Chloroform aufgenommen. Die Proben wurden für 10 min auf einem Vibrax-VXR Schüttler (IKA) geschüttelt. Nach Phasentrennung (14.000 Upm, 5 min, RT, Heraeus Biofuge 15) wurden 400 µl des Überstands in ein neues Eppendorf-Gefäß überführt und mit 1 ml Ethanol gefällt. Nach Zentrifugation (14.000 Upm, 30 sec, RT, Heraeus Biofuge 15) wurde das Pellet in 50 µl TE mit 20 µg/ml RNase A aufgenommen und bei 55°C resuspendiert.

#### *Ustilago*-Lysispuffer

50 mM Tris-Cl, pH 7,5  
50 mM Na<sub>2</sub>-EDTA  
1 % (w/v) SDS

#### TE-Phenol/Chloroform

Mischung aus gleichen Teilen Phenol (mit TE-Puffer äquilibriert) und Chloroform

### 4.3.1.3 RNA-Isolierung aus *U. maydis* Flüssigkulturen

Diese Methode ist modifiziert nach Schmitt *et al.* (1990). Zellen von einer frischen Platte wurden aus einer Vorkultur in 20 ml Medium angeimpft und bis  $OD_{600} \approx 0,5$  bei 29°C und 200 Upm inkubiert. 15 ml dieser Kultur wurden abzentrifugiert (3.000 Upm, 10 min, RT, Heraeus Varifuge 3.0R) und das Pellet in 600 µl AE-Puffer mit 1 % (w/v) SDS resuspendiert. Anschließend wurden 600 µl AE-Phenol zugegeben und die Probe 20 sec kräftig geschüttelt. Der Zellaufschluss erfolgte bei 65°C für 4 min unter ständigem Schütteln (Eppendorf Thermomixer). Im Anschluss daran wurde die Probe auf -80°C abgekühlt, bis sich Phenolkristalle bildeten (etwa 4 min). Nach Phasentrennung durch Zentrifugieren (22.000 Upm, 20 min, 4°C, Beckman Avanti30 Zentrifuge) wurde die obere wässrige Phase, welche die RNA enthält, in ein neues Gefäß überführt. Es folgte eine Extraktion mit 600 µl AE-Phenol/Chloroform. Die wässrige RNA-Lösung (400 µl) wurde danach mit 40 µl 3 M Na-Acetat pH 5,3 versetzt und mit 1 ml Ethanol gefällt (1 h bei -20°C). Nach Zentrifugation (22.000 Upm, 20 min, 4°C, Beckman Avanti30 Zentrifuge) wurde die RNA mit 70 % Ethanol gewaschen, getrocknet, in 20 – 50 µl  $H_2O_{bid.}$  aufgenommen und bei -20°C aufbewahrt. Zur Kontrolle und Konzentrationsabschätzung wurde standardmäßig 1 µl auf einem 1 %-igen TBE-Agarosegel aufgetrennt und photometrisch bei 260 nm gemessen.

#### AE-Puffer

50 mM Na-Acetat, pH 5,3  
10 mM  $Na_2$ -EDTA

#### AE-Phenol/Chloroform

Mischung aus gleichen Teilen Phenol (mit AE-Puffer äquilibriert) und Chloroform

### 4.3.1.4 RNA-Isolierung nach der alkalischen Phenol-Methode

Diese Methode ist modifiziert nach Timberlake (1986). Sie dient zur Präparation von Gesamt-RNA aus Pilzkulturen, die auf Festmedien gewachsen waren oder aus Pflanzentumormaterial. Dazu wurde das Pilzmaterial von drei Platten abgekratzt bzw.

Pflanzentumorstücke mit Hilfe einer Rasierklinge kleingeschnitten, in flüssigen Stickstoff überführt und zu einem feinen Pulver gemörsert. Das gefrorene Pulver wurde mit 5 ml RNA-Lysepuffer durchmischt und erneut mit flüssigem Stickstoff eingefroren. Die Mischung wurde zu einem feinen Pulver gemörsert, in 10 ml TE-Phenol überführt, in diesem bei RT aufgetaut und anschließend mit 0,5 ml Glasperlen für 4 min in 50 ml PPN-Röhrchen heftig geschüttelt. Dem Ansatz wurden 10 ml Chloroform zugesetzt, nach Zentrifugation (10.000 Upm, 15 min, 4°C, Beckmann Avanti30 Zentrifuge) und Phasentrennung die wässrige Phase in neue Gefäße überführt, dreimal mit dem gleichen Volumen TE-Phenol/Chloroform ausgeschüttelt, die RNA anschließend durch Zugabe von 1/3 Volumen 8 M Li-Acetat für 2 h bei 0°C gefällt und durch Zentrifugation (wie oben) pelletiert. Das Pellet wurde zweimal mit 80 % Ethanol gewaschen, nach Trocknung in 200-400 µl  $H_2O_{bid.}$  aufgenommen und bei -20°C gelagert. Zur Kontrolle und Konzentrationsabschätzung wurde standardmäßig 1 µl auf einem 1 %-igen TBE-Agarosegel aufgetrennt und photometrisch bei 260 nm gemessen.

#### RNA-Lysepuffer

Unter ständigem Rühren 40 ml Lösung 2 (12 % (w/v) Natrium-p-Aminosalicylsäure in  $H_2O_{bid.}$ , frisch ansetzen) langsam in 40 ml Lösung 3 (2 % (w/v) tri-iso-Propylnaphthalensulfonat in  $H_2O_{bid.}$ , frisch ansetzen) tropfen lassen, dann 20 ml Lösung 1 (1 M Tris-Cl, pH 8,5; 1,25 M NaCl; 250 mM EGTA in  $H_2O_{bid.}$ ) zugeben. Bei der Zugabe von Lösung 1 kann der Lysepuffer trüb oder flockig werden. Der pH wird mit NaOH auf 8,9 eingestellt. Ist der Lysepuffer trübe bzw. bildet sich ein Niederschlag, so muss er auf Eis so lange gerührt werden, bis er wieder klar wird. Vor Gebrauch kann der Lysepuffer filtriert werden; er ist auf Eis einen Tag haltbar.

## 4.3.2 Auftrennung und Nachweis von Nukleinsäuren

### 4.3.1.5 Denaturierende

#### Gelelektrophorese von RNA

Eine Denaturierung der RNA wird in dieser Methode durch eine Behandlung mit Glyoxal und DMSO erreicht. Die RNA-Probe (normalerweise 15 µg) wurde dazu in 16 µl MOPS-Puffer mit 1 M Glyoxal und 50 % DMSO für 1 h bei 50°C denaturiert, mit 4 µl RNA-Auftragspuffer versetzt und auf ein 1 % MOPS-Agarosegel aufgetragen. Die Auftrennung erfolgte bei 5-7 V/cm für 2 h, das Gel wurde nach 1 h im Puffer umgedreht und gleichzeitig die Elektrodenpolung vertauscht, um den pH-Wert des Puffers möglichst konstant zu halten. In der Regel wurden mehrere parallele Auftrennungen gleichzeitig durchgeführt.

#### MOPS-Puffer

200 mM MOPS, pH 7,0  
80 mM Na-Acetat  
10 mM Na<sub>2</sub>-EDTA

#### RNA-Auftragspuffer

50 % (w/v) Saccharose  
0,25 % (w/v) Bromphenolblau  
0,25 % (w/v) Xylencyanol FF  
in MOPS-Puffer

### 4.3.1.6 Transfer von DNA (Southern-Blot)

Diese Methode ist modifiziert nach Southern (1975). Der Transfer der aufgetrennten DNA-Fragmente aus einem Agarosegel auf eine Nylonmembran erfolgte durch Kapillar-Blot. Hierbei wird die Transfer-Lösung (0,4 M NaOH) aus einem Pufferreservoir über Kapillarkräfte durch das Gel hindurch in einen auf dem Gel platzierten Stapel Papierhandtücher gesaugt. Die DNA-Fragmente werden durch den Pufferstrom aus dem Gel eluiert und binden an die darüberliegende Nylonmembran (Hybond-N<sup>+</sup>, Amersham Pharmacia Biotech). Vor dem Transfer wurde das Agarosegel für 15 min in 0,25 M HCl inkubiert, um einen Teil

der Purine abzuspalten, damit ein Transfer großer DNA-Fragmente erleichtert wird. Anschließend wurde das Gel für 15 min in DENAT-Lösung inkubiert. Der Kapillar-Blot erfolgte in der Regel über Nacht, mindestens aber für 2 h.

#### DENAT-Lösung

1,5 M NaCl  
0,4 M NaOH

### 4.3.1.7 Transfer von RNA (Northern-Blot)

Der Transfer der Nukleinsäuren auf eine Nylonmembran (Hybond-N<sup>+</sup>, Amersham Pharmacia Biotech) erfolgte durch Kapillar-Blot in 20x SSC 2 – 4 h. Vor dem Transfer wurden die MOPS-RNA-Gele für 15 min in 20x SSC äquilibriert. Anschließend wurde die Membran getrocknet. Ein Nachweis der transferierten 18S- und 28S-rRNA-Banden auf der Membran wurde mittels Färbung mit Methylblau (200 mg/l in 300 mM Na-Acetat) durchgeführt. Dazu wurde die Membran in der Färbelösung 5 min inkubiert, anschließend mit H<sub>2</sub>O gewaschen, getrocknet und das Bandenmuster photographisch dokumentiert.

#### 20x SSC

300 mM Na-Citrat, pH 7,0  
3 M NaCl

### 4.3.1.8 Spezifischer Nachweis immobilisierter Nukleinsäuren

Die Hybond-N<sup>+</sup>-Membranen (Amersham Pharmacia Biotech) wurden zur Absättigung der unspezifischen Bindungsstellen mit Hybridisierungspuffer für 20 min bei 60°C präinkubiert. Nach Wechsel der Hybridisierungslösung wurde die bei 95°C für 5 min denaturierte radioaktive Hybridisierungsprobe zugegeben (Endkonzentration etwa 10<sup>6</sup> cpm/ml). Spezifische Hybridisierung erfolgte bei 60°C über Nacht. Die Filter wurden zweimal je 15 min bei 60°C mit Waschpuffer gewaschen. Schließlich wurden die Filter in Plastikfolie eingeschweißt und in Kassetten für den Phosphorimager STORM840 (Molecular Dynamics) exponiert. Nach 12 bis 24 Stunden

wurden die strahlungssensitiven "Screens" der Kassetten im Phosphorimager eingelesen und mit dem Computerprogramm IMAGEQUANT (Molecular Dynamics) bearbeitet.

#### Hybridisierungspuffer

50 mM Na-Phosphat-Puffer, pH 7,0  
50 mM PIPES  
100 mM NaCl  
1 mM Na<sub>2</sub>-EDTA  
5 % (w/v) SDS

#### Waschpuffer

1x SSC  
0,1 % (w/v) SDS

### 4.3.1.9 Herstellung von Hybridisierungssonden für Northern-Analysen

Doppelsträngige Hybridisierungssonden wurden mit dem NEBlot Kit (NEB Biolabs) unter Verwendung von  $\alpha^{32}\text{P}$ -dCTP hergestellt. Überschüssige Nukleotide und Oligonukleotide wurden durch Aufreinigung über Microspin S-200 Säulchen entfernt. Dabei wurden folgende DNA-Fragmente eingesetzt:

*bW/bE* ein 2.598 bp *PvuII*-Fragment aus pbW2-NdeI-bE1  
*mfa1* ein 675 bp *EcoRV*-Fragment aus pSP4,2*EcoRV*  
*pra1* ein 1,3 kb *EcoRI/EcoRV*-Fragment aus pSP4,2*EcoRV*  
*mfa2* ein 386 bp *SpeI/PstI*-Fragment aus pTZa2XhoI3,5#3  
*pra2* ein 675 bp *NcoI*-Fragment aus p123pra2  
*cbx* ein 2,2 kb *EcoRI/EcoRV*-Fragment aus pCBX122  
*frb34* ein 1.055 bp *EcoRI*-Fragment aus pfrb34  
*prf1* ein 1,5 kb *SalI/BglII*-Fragment aus pRF-4,7H  
*kpp4* ein 1,2 kb *NdeI/MluI*-Fragment aus p123crg1:kpp4-2  
*fuz7* ein 1,4 kb *NdeI/SphI*-Fragment aus p123crg1:fuz7DD

Zur Herstellung einer 18S-rRNA-spezifischen Sonde wurde ein Oligonukleotid mit der Sequenz:

AGG GGC CAA CAA AAT GTC AAC CCG T

durch Phosphorylierung des 5'-Endes radioaktiv markiert. Dabei wurden 10 pmol Oligonukleotid mit 50  $\mu\text{Ci}$   $\gamma^{32}\text{P}$ -ATP und 10 U T4-Polynukleotid Kinase (NEB Biolabs) für 45 min bei 37°C in PNK-Puffer (10 mM Tris-Cl, pH7,5; 50 mM NaCl, 10 mM MgCl<sub>2</sub>; 2 mM DTT) inkubiert. Überschüssige Nukleotide wurden durch Aufreinigung über Microspin G-25 Säulchen entfernt.

## 4.3.2 Sequenz- und Strukturanalyse

### 4.3.2.1 Sequenzierung von DNA

DNA wurde mit einem ABI 377 Sequenzierautomat von Perkin Elmer sequenziert. Vor der automatischen Sequenzierung wurde die DNA mit dem JETquick-Kit (Genomed) aufgereinigt. Die Sequenzreaktion wurde mit 35 Zyklen und unter Verwendung des BigDye-Kits nach Angabe des Herstellers (ABI) durchgeführt. Das Prinzip entspricht der Didesoxy-Methode nach Sanger *et al.* (1977): In den Reaktionsansatz werden ddNTPs gegeben, durch deren Einbau ein Kettenabbruch erfolgt. Die verschiedenen Basen sind mit unterschiedlichen Fluoreszenz-Farbstoffen markiert. Nach der Sequenzreaktion wurde die DNA gefällt. Das getrocknete Pellet wurde in 4  $\mu\text{l}$  Formamid mit 25 mM Na<sub>2</sub>-EDTA, pH 8,0 aufgenommen und 5 min bei 95°C aufgeköcht. Ein 1,5  $\mu\text{l}$  Aliquot wurde anschließend auf das Gel aufgetragen. Die Banden wurden nach der Auftrennung in einem Sequenzgel und Anregung durch einen Laser von einer Photozelle detektiert. Die erhaltenen Daten wurden mit der Software des ABI377 Systems auf einem Apple Macintosh ausgewertet und die so erhaltenen Sequenz-Rohdaten konnten zur weiteren Bearbeitung in das Programm SEQUENCENAVIGATOR (ABI) exportiert werden.

### 4.3.2.2 Sequenz- und Strukturanalyse

Es wurden folgende Programme benutzt:

**SEQUENCENAVIGATOR 1.0.1** (ABI) zur Bearbeitung von Sequenz-Rohdaten und zum Vergleich von DNA-Sequenzen.



**DNA-STRIDER 1.3** (Douglas, 1995; Marck, 1988) zur Erstellung und zur Bearbeitung von Plasmid- und genomischen Sequenzen.

**BLAST2** (Altschul *et al.*, 1990; Altschul *et al.*, 1997) zur Identifikation ähnlicher Proteine oder DNA-Sequenzen in den öffentlichen Datenbanken.

**SMART** (Schultz *et al.*, 2000; Schultz *et al.*, 1998) zur Identifikation konservierter Domänen in Proteinen, bzw. zur Identifikation von Proteinen mit ähnlichen Domänen oder ähnlicher Domänenstruktur.

**PSORT2** (Nakai und Horton, 1999; Nakai und Kanehisa, 1992) zur Vorhersage der subzellulären Lokalisierung von Proteinen.

**SIGNALP** (Nielsen *et al.*, 1997a; Nielsen *et al.*, 1997b) zur Identifikation N-terminaler Signalpeptide.

**PESTFIND** (Rechsteiner und Rogers, 1996; Rogers *et al.*, 1986) zur Identifikation von PEST-Sequenzen in einem Protein

**ISREC**, **INTERPROSCAN** und **DART** zur Identifikation konservierter Domänen bzw. zur Suche nach Motiven ähnlicher Proteine.

[http://hits.isb-sib.ch/cgi-bin/hits\\_motifscan](http://hits.isb-sib.ch/cgi-bin/hits_motifscan)

<http://www.ebi.ac.uk/interpro/scan.html>

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/lexington/lexington.cgi?cmd=rpszur>

**CLUSTALW** (Eddy, 1995) und **CLUSTALX** (Heringa, 1999) zum Vergleich und aneinander Anpassen (Alignment) mehrerer Protein- oder DNA-Sequenzen.

**SEQVU 1.0.1** (The Garvan Institute of Medical Research, Sidney) zur Nachbearbeitung von Sequenz-Alignments.

### 4.3.3 PCR-Techniken

#### 4.3.3.1 Standard-PCR-Ansätze

Die Methode ist modifiziert nach Innis *et al.* (1990). Ein typischer PCR-Ansatz enthielt etwa 10 ng Template-DNA, die beiden Oligonukleotide in einer Endkonzentration von 1 µM, dNTPs in einer Endkonzentration von 200 µM (d.h. je 200 µM dATP, dCTP, dGTP und dTTP) in PCR-Puffer. Standardmäßig wurden die Reaktionen in einem Volumen von 50 µl mit Hot-Start durchgeführt, Bei Verwendung der aufgeführten

Oligonukleotide und einer Amplifikatlänge von unter 1 kb sah ein typisches Protokoll folgendermaßen aus:

94°C/4 min - 1U $Taq$ -94°C/1 min - [94°C/1 min - 65°C/1 min - 72°C/1 min]x 30 - 72°C/5 min

Bei Benutzung anderer Oligonukleotide oder Herstellung längerer Amplifikate mussten die Hybridisierungstemperatur bzw. die Elongationszeit entsprechend angepasst werden. Es wurden die PCR-Geräte OmniGene (Hybaid), PTC100 (MJ Research) und Robocycler Gradient96 (Stratagene) verwendet.

#### 4.3.3.2 Ganz-Zell-PCR aus *U. maydis*-Zellen

Diese Technik ist ausführlich in Brachmann (2001) beschrieben und ermöglicht eine Vorauswahl richtiger Transformanten. In dieser Methode werden Zellen der Transformanten durch 10 min initialer Denaturierungszeit zum Platzen gebracht und so genomische DNA freigesetzt, die nun als Matritze für die PCR dient. Diese PCR-Analysen werden so durchgeführt, dass sich im Fall einer erfolgreichen homologen Rekombination kein Amplifikat ergeben sollte, dagegen im Wildtyp eine Bande erkennbar war. Anschließend werden die Kandidaten durch Southern-Analyse bestätigt. Es wurden in dieser Arbeit folgende Kombinationen an Oligonukleotiden eingesetzt:

<i>ip</i> -Locus:	OAN74/OAN75 OAN74/OAN76 OAN77/OAN78
<i>kpp2</i> :	kpp2-POPI/kpp2-POPII K50RII/K50RIII, <i>Bsp</i> EI-Verdau des PCR Produkts
<i>kpp4</i> :	kpp4-POPI/kpp4-POPII
<i>prf1</i> :	prf1-POPI/prf1-POPII

#### 4.3.3.3 Gerichtete PCR-Mutagenese

Die gerichtete PCR-Mutagenese wurde zur Erzeugung aller in dieser Arbeit hergestellten Allele verwendet. Diese Methode ist leicht abgewandelte Form der sogenannten "Megaprimer"-Technik (Chen und Przybyla, 1994). Dabei wurde zunächst ein kurzes (100 - 400 bp langes) PCR-Fragment erzeugt, wobei mit einem der beiden Oligonukleotide die gewünschte Mutation eingefügt wurde. Dieses Fragment, der sogenannte

"Megaprimer", wurde in einem zweiten PCR-Ansatz zusammen mit einem weiteren Oligonukleotid eingesetzt, so dass eine gewünschte Mutation in der Mitte des so entstandenen

Amplifikats liegt. Abschließend wurde dieses Fragment in pCR2.1-TOPO kloniert und sequenziert.

## 4.4 Biochemische Methoden

### 4.4.1 SDS-Gelelektrophorese von Proteinen

Es wurde die Methode der diskontinuierlichen SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) angewendet (Laemmli, 1970). Dafür wurde eine Mini Protean II Apparatur (Biorad) benutzt bei 25 mA für 1 h aufgetrennt. Zur Detektion der Proteinbanden und des Größenmarkers wurden die Gele nach der Auftrennung für 10 min in Coomassie-Färbelösung gefärbt und anschließend in Entfärbelösung entfärbt, bis die Banden gut sichtbar waren.

#### SDS-PAGE-Probenpuffer (6x)

- 300 mM Tris-Cl, pH 8,0
- 30 % (v/v) Glycerin
- 20 % (w/v) SDS
- 0,5 g/l Bromphenolblau
- 15 % (v/v)  $\beta$ -Mercaptoethanol (frisch zugeben)

#### Proteingel-Laufpuffer

- 25 mM Tris-Cl, pH 8,8
- 200 mM Glycin
- 0,1 % (w/v) SDS

#### Sammelgel

- 125 mM Tris-Cl, pH 6,8
- 5 % (w/v) Acrylamid
- 0,13 % (w/v) Bisacrylamid
- 0,1 % (w/v) SDS
- 0,1 % (w/v) Ammoniumpersulfat
- 0,1 % (v/v) TEMED

#### Trenngel

- 375 mM Tris-Cl, pH 8,8
- 10 % bzw. 15 % (w/v) Acrylamid
- 0,27 % (w/v) Bisacrylamid
- 0,1 % (w/v) SDS
- 0,1 % (w/v) Ammoniumpersulfat
- 0,1 % (v/v) TEMED

#### Coomassie-Färbelösung

- 0,25 % (w/v) Coomassie Brilliant Blue R-250
- 45 % (v/v) Methanol
- 10 % (v/v) Essigsäure

#### Entfärbelösung

- 45 % (v/v) Methanol
- 10 % (v/v) Essigsäure

### 4.4.2 Transfer von Proteinen (Western-Blot)

Die im Gel aufgetrennten Proteine wurden mittels eines Semi-Dry Elektro-Blots (UniEquip) in einem dreistufigen Puffersystem auf eine Nitrozellulose-Membran (Immobilon-P von Millipore) transferiert. Dabei wurde das Gel zunächst für 10 min in Kathodenpuffer äquilibriert und die Membran für 10 sec in Methanol aktiviert, mit  $H_2O_{bid.}$  gewaschen und mit Anodenpuffer 2 äquilibriert. Der Blot wurde folgendermaßen aufgebaut (von unten = Kathode nach oben = Anode): drei Whatman-Papiere, getränkt in Kathodenpuffer; das Polyacrylamidgel; die Nitrozellulose-Membran; ein Whatman-Papier, getränkt in Anodenpuffer 2; zwei Whatman-Papiere, getränkt in Anodenpuffer 1. Durch Anlegen der Spannung (1 h, 1 mA/cm<sup>2</sup>) wurden die Proteine auf die Membran transferiert.

#### Anodenpuffer 1

- 300 mM Tris-Cl, pH 10,4
- 15 % (v/v) Methanol

#### Anodenpuffer 2

- 30 mM Tris-Cl, pH 10,4
- 15 % (v/v) Methanol

#### Kathodenpuffer

- 25 mM Tris-Cl, pH 9,4
- 40 mM  $\epsilon$ -Aminocapronsäure
- 15 % (v/v) Methanol

### 4.4.3 Nachweis von immobilisierten Proteinen

Der immunologische Nachweis von Proteinen erfolgte mit Hilfe der an die sekundären Antikörper gekoppelten Meerrettich-Peroxidase (HRP). Dazu wurde die Nitrozellulose-Membran nach dem Elektro-Blot zunächst für 1 h mit 5 % Magermilchpulver in TBST geblockt. Anschließend wurde die Membran zweimal für 10 min mit TBST gewaschen und für 1 - 12 h mit dem primären Antikörper, verdünnt in TBST 1 % Magermilchpulver, inkubiert. Nach dreimaligem Waschen für 10 min mit TBST wurde die Membran für 1 - 12 h mit dem sekundären Antikörper, verdünnt in TBST mit 1 % Magermilchpulver, inkubiert. Abschließend wurde die Membran dreimal für 10 min mit TBST gewaschen. Es wurden folgende primären Antikörper verwendet: monoklonaler Maus- $\alpha$ -GFP (1  $\mu$ g/ $\mu$ l, Roche, in einer Verdünnung von 1:5.000); monoklonaler Maus- $\alpha$ - $\alpha$ Tubulin (Ab1) gegen Hühner  $\alpha$ Tubulin, (Oncogene, in einer Verdünnung von 1:5.000); monoklonaler Maus- $\alpha$ -GAL4-DNA-BD sowie  $\alpha$ -GAL4-AD (Clontech). Und als sekundärer Antikörper der HRP-gekoppelte Ziege- $\alpha$ -Maus von Promega (in einer Verdünnung von 1:10.000). Zur Detektion wurden die frisch angesetzten Lösungen ECL I und ECL II zu gleichen Teilen gemischt, auf der Membran verteilt, diese nach 1 min kurz abgetrocknet, in einen Plastikbeutel gelegt, damit ein Röntgenfilm belichtet und dieser entwickelt. Je nach Signalstärke waren nach 1 sec bis 5 min Exposition deutliche Banden zu erkennen.

#### TBST

20 mM Tris-Cl, pH 7,6  
136 mM NaCl  
0,05 % (v/v) Tween 20

#### ECL I

100 mM Tris-Cl, pH 8,0  
0,44 % (v/v) p-Coumarinsäure in DMSO  
1 % (v/v) Luminol (Fluka) in DMSO

#### ECL II

100 mM Tris-Cl, pH 8,0  
0,018 % (v/v) H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>

### 4.4.4 Überexpression und Reinigung von GST-Fusionsproteinen aus *E. coli*

Die Expression der GST-Fusionsproteine erfolgte in dem *E. coli* Stamm BL21::DE3[pLysS], der mit den entsprechenden pGEX-2T-Derivaten transformiert worden war. Diese *E. coli* Zellen wurden in 500 ml dYT Flüssigmedium (+ 1 % Glukose, 100  $\mu$ g/ml Ampicilin und 34  $\mu$ g/ml Chloramphenicol) bis zu einer OD<sub>600</sub> von ~ 0,5 bei 37°C kultiviert. Danach wurden die Zellsuspensionen auf Eis gekühlt und die Expression mit 1 mM IPTG induziert. Die Inkubation erfolgte dann für 16 h bei 16°C. Die Zelle wurden geerntet (3.500 Upm, 4°C, Sorval, Rotor GS3) und 1x in 25 ml Puffer A und dann in 25 ml Puffer A+ (PufferA mit *protease inhibitor cocktail* Complete; Roche) gewaschen. Durch zweimaliges Einfrieren und Auftauen wurden die Zellen lysiert, die chromosomale DNA wurde durch Zugabe von DNase/MgCl<sub>2</sub> (f. c. 10  $\mu$ g/ml bzw. 5 mM) und 10 min Inkubation bei 4°C sowie Sonifikation verdaut bzw. geschert und unlösliche Partikel durch eine Zentrifugation (4°C, 30 min, 28.000 g) abgetrennt. Der Überstand wurde mit 1 ml GSH-Sepharose (Amersham Bioscience) 1 h bei 4°C auf einem Rollinkubator inkubiert. Die GSH-Sepharose wurde dann pelletiert (2.300 Upm, 4°C, Heraeus Varifuge 3.0R), in 12 ml Puffer A+ aufgenommen und 6x mit 12 ml Puffer B+ gewaschen. Die Elution erfolgte mit 2x 1,5 ml GST-Elutionspuffer jeweils für 1 h bei 4°C. Die Elluate wurden dann mit PD10-Säulen (Amersham Bioscience, mit 25 ml Puffer C äquilibriert) in acht 500  $\mu$ l Aliquots fraktioniert. Dadurch wurden die Proteine in Puffer C aufkonzentriert. Die proteinreichsten Fraktionen wurden dann mittels SDS-PAGE bestimmt und bei -80°C gelagert.

#### Puffer A

50 mM Tris-HCl pH 7,5  
250 mM NaCl  
2,5 mM EDTA  
2,5 mM EGTA  
1 % Triton X-100  
1mM DTT

#### **Puffer B**

50 mM Tris-HCl pH 7,5  
125 mM NaCl  
2,5 mM EDTA  
2,5 mM EGTA  
0,1 % Triton X-100  
1 mM DTT

#### **GST-Elutionspuffer**

50 mM Glutathion (reduziert)  
50 mM NaOH pH 8,0  
1 mM DTT

#### **Puffer C**

Puffer B mit 50 % Glycerin

### **4.4.5 Isolierung von Proteinen aus *S. cerevisiae***

Der Extrakt wurde aus 2 OD<sub>600</sub> Zellen einer Übernachtskultur mit einer OD<sub>600</sub> = 0,5 - 1,0 hergestellt. Diese Zellen wurden mit 1,5 ml 50 mM Tris-HCl pH 7,5, 10 mM NaN<sub>3</sub> gemischt und pelletiert (14.000 Upm, 5 min, RT, Heraeus Biofuge 15). Das Zellpellet wurde in 30 µl ESB aufgenommen und bei 95°C 3 min inkubiert. Zu dieser Probe kamen dann 0,1 g Glasperlen und diese Mischung wurde dann 2 min gevortext. Es wurden weitere 70 µl ESB zugesetzt, kurz gemischt und 1 min bei 95°C erhitzt und 20 µl auf ein SDS-PAGE aufgetragen.

#### **ESB**

2 % SDS  
80 mM Tris-HCl pH 8,0  
10 % Glycerin  
1,5 % DTT  
0,1 mg/ml Bromphenolblau

### **4.4.6 Isolierung von Proteinen aus *U. maydis***

Der zutestende *U. maydis*-Stamm wurde bis zu einer OD<sub>600</sub> = 0,8 in 50 ml CM-1 %-Glukose-Flüssigmedium angezogen, die Zellen geerntet (3.500 Upm, 4°C, Heraeus Varifuge 3.0R), einmal in PBS gewaschen und in 5 ml PBS+ (PBS mit *protease inhibitor cocktail* Complete, Roche) oder in einem speziellen Puffer der jeweiligen Methode aufgenommen. Die Zellen wurden dann durch eine French-Press (maximaler Druck) in dreimaliger

Wiederholung aufgeschlossen. Die Zelltrümmer wurden durch Zentrifugation entfernt (4°C, 30 min, 33.300 Upm).

Die Proteinkonzentration wurde nach der Methode von Bradford (BioRad) bestimmt und üblicherweise 50 µg Gesamtprotein in die SDS-PAGE-Analyse eingesetzt.

### **4.4.7 GST-Pulldown-Assay**

Für die „GST-Pulldown-Assays“ wurden die GST-Fusionproteine wie unter 4.4.4 beschrieben in *E. coli* exprimiert. Für diese Experimente wurden Proteinextrakte jeweils aus 50 ml dYT (+ 1 % Glukose, 100 µg/ml Ampicilin und 34 µg/ml Chloramphenicol) hergestellt und mit 50 µl GSH-Sepharose für 1 h bei 4°C inkubiert. Darauf wurde die GSH-Sepharose 1x mit 1 ml GST-pulldown Puffer (GPB) gewaschen und mit geklärten Proteinextrakt aus *U. maydis* (gesamt Menge an Protein 1 mg), der in GPB+ (GPB mit *protease inhibitor cocktail* Complete, Roche) hergestellt wurde, versetzt. Danach wurden die Ansätze 5x mit 1 ml GPB+ gewaschen, und in 50 µl 2x SDS-PAGE-Probenpuffer resuspendiert und für 5 min bei 95°C gekocht. Nach einer kurzen Zentrifugation wurden je 10 µl auf zwei 10 %-igen SDS-PAGEs geladen und die GST-Fusionproteine mittels Coomassie-Färbung, sowie die GFP-Fusionsproteine mittels Western-Analyse nachgewiesen.

#### **GST-pulldown Puffer**

50 mM Tris-HCl pH 7,5  
150 mM NaCl  
0,5 % NP40  
5 mM EDTA  
1 mM DTT

### **4.4.8 Kinaseaktivitätstest**

Um die Kinaseaktivität von GST-Kpp2, GST-Kpp2K50R, GST-Kpp6C und GST zu testen, wurden die Proteinextrakte der jeweiligen *E. coli*-Transformanten aus 50 ml Flüssigkultur (wie unter 4.4.4 beschrieben) mit 50 µl GSH-Sepharose für 1 h bei 4°C inkubiert und wie unter 4.4.4 beschrieben aufgereinigt. Darauf wurden die an GSH-Sepharose immobilisierten Proteine 1x mit 1 ml Kinasepuffer (KB, 4°C) gewaschen und in

zwei 500 µl Portionen geteilt. Die eine Portion wurde in 50 µl 2x SDS-PAGE-Probenpuffer resuspendiert und für 5 min bei 95°C gekocht. Nach einer kurzen Zentrifugation wurden je 20 µl auf ein 10 % SDS-PAGE geladen und die GST-Fusionsproteine mittels Coomassie-Färbung nachgewiesen. Die andere Portion wurde einem Kinasetest zugeführt (siehe unten).

#### Kinasepuffer

20 mM HEPES pH 7,4  
15 mM MgCl<sub>2</sub>  
5 mM EGTA  
1 mM DTT

Um die Proteinextrakte für die Kpp2-GFP Immunopräzipitation aus Pheromon-behandelten *U. maydis*-Stämme zu erhalten, wurden die Zellen in 50 ml CM-1 %-Glukose-Flüssigmedium bis zu einer OD<sub>600</sub> ~ 0,8 angezogen, die Kulturen in ein 50 ml PPN Röhrchen transferiert, mit 2,5 µg/ml synthetischem Pheromon versetzt, und auf bei 28°C bei leichtem Rollen inkubiert. Um die Proteinextrakte aus *fuz7DD*-induzierten Zellen zu erhalten, wurden die zu testenden Stämme in 50 ml CM-1 %-Glukose-Flüssigmedium zu einer OD<sub>600</sub> von ~ 0,8 angezogen zweimal mit Wasser gewaschen und in 50 ml CM-1 %-Arabinose-Flüssigmedium resuspendiert. In beiden Versuchen (Pheromon sowie *fuz7DD*-induziert) wurden die zu testenden Zellen einmal in 20 ml IP-Puffer gewaschen und in 5 ml eiskalten IP-Puffer+ (IP-Puffer mit mit *protease inhibitor cocktail* Complete, Roche; und Phosphatase-Inhibitoren, Sigma P-2850 and P-5726) resuspendiert.

Aus den geklärten Proteinextrakten wurden dann die Kpp2-GFP Fusionsproteine immunopräzipitiert. Dafür wurden Portionen, die 1 mg Gesamtprotein enthalten, mit 50 µl Dynabeads® Protein G (Dyna), an denen 0,5 µg polyklonaler α-GFP-Antikörper (Biocat, Heidelberg, 3999100) immobilisiert worden waren, für 1 h bei 4°C inkubiert. Die präzipitierten Dynabeads wurden 1x mit 1 ml IP-Puffer+, 5x mit 1 ml IP-Waschpuffer und 1x mit 1 ml kb+ gewaschen. Die Dynabeads wurden in zwei Portionen zu je 500 µl aufgeteilt. Von der einen Portion wurde der Überstand entfernt, die Dynabeads in 50 µl 2x SDS-PAGE-Probenpuffer resuspendiert, für 5 min bei 95°C gekocht, und 20 µl davon in eine 10 %-ige SDS-PAGE

eingesetzt, um die Mengen an präzipitierten Kpp2-GFP Fusionsproteinen in einer Western-Analyse nachzuweisen. Die andere Portion wurde einem Kinasetest zugeführt (siehe unten).

#### IP-Puffer

25 mM Tris-HCl pH 7,5  
10 mM MgCl<sub>2</sub>  
15 mM EGTA  
75 mM NaCl  
0,1 % Tween 20  
1 mM DTT

#### IP-Waschpuffer

50 mM Tris-HCl pH 7,5  
250 mM NaCl  
0,1 % Tween 20  
1 mM DTT  
5 mM EDTA  
5 mM EGTA

#### Kinasetest

Für den Kinasetest wurde von den zu testenden Proben der restliche Überstand entfernt, die GSH-Sepharose/Dynabeads in 20 µl Kinase-Assay-Puffer (KAB, 20°C) resuspendiert und für 20 min bei 28°C inkubiert. Die Reaktionen wurden mit der Zugabe von 20 µl 2x SDS-PAGE-Probenpuffer und einer Inkubation für 5 min bei 95°C gestoppt. Von diesen Ansätzen wurde 5 ml auf einer Analyse mittels 15 %-iger SDS-PAGE zugeführt. Um die Substrat-Phosphorylierung (MBP oder GST-Prf1<sub>441-566</sub>) nachzuweisen, wurde das Gel getrocknet und auf einem Phosphorimager (Molecular Dynamics) exponiert.

#### Kinase-Assay-Puffer

Kinasepuffer mit folgenden Zutaten:  
50 mM Na-β-Glycerolphosphate  
5 mM NaVO<sub>3</sub>  
50 µM ATP  
5 mM MgCl<sub>2</sub>  
0,2 µM (γ-<sup>32</sup>P) ATP [6000Ci/mmol]  
und 1 mg/ml *myelin basic protein* (MBP; Gibco) oder 0,5 mg/ml GST-Prf1<sub>441-566</sub>



## 5 Literaturverzeichnis

- Adachi, K. und Hamer, J. E. (1998) Divergent cAMP signaling pathways regulate growth and pathogenesis in the rice blast fungus *Magnaporthe grisea*. *Plant Cell*, **10**, 1361-1374.
- Adachi, M., Fukuda, M. und Nishida, E. (1999) Two co-existing mechanisms for nuclear import of MAP kinase: passive diffusion of a monomer and active transport of a dimer. *EMBO J*, **18**, 5347-5358.
- Alessi, D. R., Saito, Y., Campbell, D. G., Cohen, P., Sithanandam, G., Rapp, U., Ashworth, A., Marshall, C. J. und Cowley, S. (1994) Identification of the sites in MAP kinase kinase-1 phosphorylated by p74raf-1. *EMBO J*, **13**, 1610-1619.
- Alonso-Monge, R., Navarro-Garcia, F., Molero, G., Diez-Orejas, R., Gustin, M., Pla, J., Sanchez, M. und Nombela, C. (1999) Role of the mitogen-activated protein kinase Hog1p in morphogenesis and virulence of *Candida albicans*. *J Bacteriol*, **181**, 3058-3068.
- Alspaugh, J. A., Pukkila-Worley, R., Harashima, T., Cavallo, L. M., Funnell, D., Cox, G. M., Perfect, J. R., Kronstad, J. W. und Heitman, J. (2002) Adenylyl cyclase functions downstream of the G $\alpha$  protein Gpa1 and controls mating and pathogenicity of *Cryptococcus neoformans*. *Eukaryot Cell*, **1**, 75-84.
- Altschul, S. F., Gish, W., Miller, W., Myers, E. W. und Lipman, D. J. (1990) Basic local alignment search tool. *J Mol Biol*, **215**, 403-410.
- Altschul, S. F., Madden, T. L., Schaffer, A. A., Zhang, J., Zhang, Z., Miller, W. und Lipman, D. J. (1997) Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res*, **25**, 3389-3402.
- Anderson, K. V., Jürgens, G. und Nüsslein-Volhard, C. (1985) Establishment of dorsal-ventral polarity in the *Drosophila* embryo: genetic studies on the role of the Toll gene product. *Cell*, **42**, 779-789.
- Andrews, D. L., Egan, J. D., Mayorga, M. E. und Gold, S. E. (2000) The *Ustilago maydis* *ubc4* and *ubc5* genes encode members of a MAP kinase cascade required for filamentous growth. *Mol Plant Microbe Interact*, **13**, 781-786.
- Aono, T., Yanai, H., Miki, F., Davey, J. und Shimoda, C. (1994) Mating pheromone-induced expression of the *mat1-Pm* gene of *Schizosaccharomyces pombe*: identification of signalling components and characterization of upstream controlling elements. *Yeast*, **10**, 757-770.
- Arkinstall, S. J., Papasavvas, S. G. und Payton, M. A. (1991) Yeast alpha-mating factor receptor-linked G-protein signal transduction suppresses Ras-dependent activity. *FEBS Lett*, **284**, 123-128.
- Ausubel, F. M., Brenz, R., Kingston, R. E., Moore, D. D., Seidman, J. G., Smith, J. A. und Strukl, K. (1987) *Current Protocols in Molecular Biology*. John Wiley & Sons, Inc., USA.
- Bai, C. und Elledge, S. (1997) Gene identification using the yeast two-hybrid system. *Methods Enzymol*, **283**, 141-156.
- Ballard, M. J., Tyndall, W. A., Shingle, J. M., Hall, D. J. und Winter, E. (1991) Tyrosine phosphorylation of a yeast 40 kDa protein occurs in response to mating pheromone. *EMBO J*, **10**, 3753-3758.
- Banuett, F. (2002) Pathogenic Development in *Ustilago maydis*: A progression of morphological transitions that results in tumor formation and teliospore produktion. In Osiewacz, H. (ed.), *Molecular Biology of Fungal Development*, pp. 399-418.
- Banuett, F. und Herskowitz, I. (1989) Different *a* alleles are necessary for maintenance of filamentous growth but not for meiosis. *Proc Natl Acad Sci USA*, **86**, 5878-5882.
- Banuett, F. und Herskowitz, I. (1994a) Identification of *fuz7*, a *Ustilago maydis* MEK/MAPKK homolog required for *a*-locus-dependent and -independent steps in the fungal life cycle. *Genes Dev*, **8**, 1367-1378.
- Banuett, F. und Herskowitz, I. (1994b) Morphological transitions in the life cycle of *Ustilago maydis* and their genetic control by the *a* and *b* loci. *Exp Mycology*, **18**, 247-266.
- Banuett, F. und Herskowitz, I. (1996) Discrete developmental stages during teliospore formation in the corn smut fungus, *Ustilago maydis*. *Development*, **122**, 2965-2976.

- Bardwell, A. J., Flatauer, L. J., Matsukuma, K., Thorner, J. und Bardwell, L. (2001) A conserved docking site in MEKs mediates high-affinity binding to MAP kinases and cooperates with a scaffold protein to enhance signal transmission. *J Biol Chem*, **276**, 10374-10386.
- Bardwell, L., Cook, J. G., Voora, D., Baggott, D. M., Martinez, A. R. und Thorner, J. (1998) Repression of yeast Ste12 transcription factor by direct binding of unphosphorylated Kss1 MAPK and its regulation by the Ste7 MEK. *Genes Dev*, **12**, 2887-2898.
- Barr, M. M., Tu, H., Van Aelst, L. und Wigler, M. (1996) Identification of Ste4 as a potential regulator of Byr2 in the sexual response pathway of *Schizosaccharomyces pombe*. *Mol Cell Biol*, **16**, 5597-5603.
- Barrett, K. J., Gold, S. E. und Kronstad, J. W. (1993) Identification and complementation of a mutation to constitutive filamentous growth in *Ustilago maydis*. *Mol Plant Microbe Interact*, **6**, 274-283.
- Bartel, P., Chien, C. T., Sternglanz, R. und Fields, S. (1993) Elimination of false positives that arise in using the two-hybrid system. *Biotechniques*, **14**, 920-924.
- Bateson, W. (1909) The progress of genetics since the rediscovery of Mendel's papers. *Progressus rei botanicae*, **1**, 368-418.
- Bauch, R. (1932) Die Sexualität von *Ustilago scorzonerae* und *Ustilago maydis*. *Phytopathologische Zeitung*, **5**, 315-321.
- Bauman, P. und Albright, C. F. (1998) Functional analysis of domains in the Byr2 kinase. *Biochimie*, **80**, 621-625.
- Bauman, P., Cheng, Q. C. und Albright, C. F. (1998) The Byr2 kinase translocates to the plasma membrane in a Ras1-dependent manner. *Biochem Biophys Res Commun*, **244**, 468-474.
- Bell, M., Capone, R., Pashtan, I., Levitzki, A. und Engelberg, D. (2001) Isolation of hyperactive mutants of the MAPK p38/Hog1 that are independent of MAPK kinase activation. *J Biol Chem*, **276**, 25351-25358.
- Blumer, K. J. und Thorner, J. (1990) Beta and gamma subunits of a yeast guanine nucleotide-binding protein are not essential for membrane association of the alpha subunit but are required for receptor coupling. *Proc Natl Acad Sci USA*, **87**, 4363-4367.
- Bölker, M., Böhnert, H. U., Braun, K. H., Görl, J. und Kahmann, R. (1995a) Tagging pathogenicity genes in *Ustilago maydis* by restriction enzyme-mediated integration (REMI). *Mol Gen Genet*, **248**, 547-552.
- Bölker, M., Genin, S., Lehmler, C. und Kahmann, R. (1995b) Genetic regulation of mating, and dimorphism in *Ustilago maydis*. *Can J Bot*, **73**, 320-325.
- Bölker, M., Urban, M. und Kahmann, R. (1992) The *a* mating type locus of *U. maydis* specifies cell signaling components. *Cell*, **68**, 441-450.
- Borges-Walmsley, M. I. und Walmsley, A. R. (2000) cAMP signalling in pathogenic fungi: control of dimorphic switching and pathogenicity. *Trends Microbiol*, **8**, 133-141.
- Börner, H. (1997) *Pflanzenkrankheiten und Pflanzenschutz*. Eugen Ulmer Verlag, Stuttgart.
- Bottin, A., Kämper, J. und Kahmann, R. (1996) Isolation of a carbon source-regulated gene from *Ustilago maydis*. *Mol Gen Genet*, **253**, 342-352.
- Bourne, H. R., Sanders, D. A. und McCormick, F. (1990) The GTPase superfamily: a conserved switch for diverse cell functions. *Nature*, **348**, 125-123.
- Brachmann, A. (2001) Die frühe Infektionsphase von *Ustilago maydis*: Genregulation durch das bW/bE-Heterodimer. *Fakultät für Biologie*. Ludwig-Maximilians-Universität, München.
- Brachmann, A., Schirawski, J., Müller, P. und Kahmann, R. (2003) An unusual MAP kinase is required for efficient penetration of the plant surface by *U. maydis*. *EMBO J*, **22**, im Druck.
- Brachmann, A., Weinzierl, G., Kämper, J. und Kahmann, R. (2001) The bW/bE heterodimer regulates a distinct subset of genes in *Ustilago maydis*. *Mol Microbiol*, **42**, 1047-1063.
- Brizzo, V., Gammie, A. E., Nijbroek, G., Michaelis, S. und Rose, M. D. (1996) Cell fusion during yeast mating requires high levels of a-factor mating pheromone. *J Cell Biol*, **135**, 1727-1739.
- Brunnet, A. und Pouyssegur, J. (1996) Identification of MAP kinase domains by redirecting stress signals into growth factor responses. *Science*, **272**, 1653-1655.
- Caffrey, D. R., O'Neill, L. A. J. und Shields, D. C. (1999) The evolution of the MAP kinase pathways: Coduplication of interacting proteins leads to new signaling cascades. *J Mol Evol*, **49**, 567-582.



- Cairns, B. R., Ramer, S. W. und Kornberg, R. D. (1992) Order of action of components in the yeast pheromone response pathway revealed with a dominant allele of the STE11 kinase and the multiple phosphorylation of the STE7 kinase. *Genes Dev*, **6**, 1305-1318.
- Canagarajah, B. J., Khokhlatchev, A., Cobb, M. H. und Goldsmith, E. J. (1997) Activation mechanism of the MAP kinase ERK2 by dual phosphorylation. *Cell*, **90**, 859-869.
- Chen, B. und Przybyla, A. E. (1994) An efficient site-directed mutagenesis method based on PCR. *Biotechniques*, **17**, 657-659.
- Chen, J., Chen, J., Lane, S. und Liu, H. (2002) A conserved mitogen-activated protein kinase pathway is required for mating in *Candida albicans*. *Mol Microbiol*, **46**, 1335-1344.
- Chen, Z., Gibson, T. B., Robinson, F., Silvestro, L., Pearson, G., Xu, B., Wright, A., Vanderbilt, C. und Cobb, M. H. (2001) MAP kinases. *Chem Rev*, **101**, 2449-2476.
- Choi, K. Y., Satterberg, B., Lyons, D. M. und Elion, E. A. (1994) Ste5 tethers multiple protein kinases in the MAP kinase cascade required for mating in *S. cerevisiae*. *Cell*, **78**, 499-512.
- Choi, W. und Dean, R. A. (1997) The adenylate cyclase gene *MAC1* of *Magnaporthe grisea* controls appressorium formation and other aspects of growth and development. *Plant Cell*, **9**, 1973-1983.
- Christensen, J. J. (1963) Corn smut induced by *Ustilago maydis*. *Amer Phytopathol Soc Monogr*, **2**.
- Clark-Lewis, I., Sanghera, J. S. und Pelech, S. L. (1991) Definition of a consensus sequence for peptide substrate recognition by p44mpk, the meiosis-activated myelin basic protein kinase. *J Biol Chem*, **266**, 15180-15184.
- Clarke, D. L., Woodlee, G. L., McClelland, C. M., Seymour, T. S. und Wickes, B. L. (2001) The *Cryptococcus neoformans* STE11 $\alpha$  gene is similar to other fungal mitogen-activated protein kinase kinase kinase (MAPKKK) genes but is mating type specific. *Mol Microbiol*, **40**, 200-213.
- Cohen, S. N., Chang, A. C. und Hsu, L. (1972) Nonchromosomal antibiotic resistance in bacteria: genetic transformation of *Escherichia coli* by R-factor DNA. *Proc Natl Acad Sci USA*, **69**, 2110-2114.
- Cook, J. G., Bardwell, L. und Thorner, J. (1997) Inhibitory and activating functions for MAPK Kss1 in the *S. cerevisiae* filamentous-growth signalling pathway. *Nature*, **390**, 85-88.
- Csank, C., Schroppel, K., Leberer, E., Harcus, D., Mohamed, O., Meloche, S., Thomas, D. Y. und Whiteway, M. (1998) Roles of the *Candida albicans* mitogen-activated protein kinase homolog, Cek1p, in hyphal development and systemic candidiasis. *Infect Immun*, **66**, 2713-2721.
- D'Souza, C. A., Alspaugh, J. A., Yue, C., Harashima, T., Cox, G. M., Perfect, J. R. und Heitman, J. (2001) Cyclic AMP-dependent protein kinase controls virulence of the fungal pathogen *Cryptococcus neoformans*. *Mol Cell Biol*, **21**, 3179-3191.
- D'Souza, C. A. und Heitman, J. (2001) Conserved cAMP signaling cascades regulate fungal development and virulence. *FEMS Microbiol Rev*, **25**, 349-364.
- Di Pietro, A., Garcia-MacEira, F. I., Meglecz, E. und Roncero, M. I. (2001) A MAP kinase of the vascular wilt fungus *Fusarium oxysporum* is essential for root penetration and pathogenesis. *Mol Microbiol*, **39**, 1140-1152.
- Diez-Orejas, R., Molero, G., Navarro-Garcia, F., Pla, J., Nombela, C. und Sanchez-Perez, M. (1997) Reduced virulence of *Candida albicans* MKC1 mutants: a role for mitogen-activated protein kinase in pathogenesis. *Infect Immun*, **65**, 833-837.
- Dixon, K. P., Xu, J. R., Smirnov, N. und Talbot, N. J. (1999) Independent signaling pathways regulate cellular turgor during hyperosmotic stress and appressorium-mediated plant infection by *Magnaporthe grisea*. *Plant Cell*, **11**, 2045-2058.
- Dolan, J. W., Kirkman, C. und Fields, S. (1989) The yeast Ste12 protein binds to the DNA sequence mediating pheromone induction. *Proc Natl Acad Sci USA*, **86**, 5703-5707.
- Douglas, S. E. (1995) DNA Strider. An inexpensive sequence analysis package for the Macintosh. *Mol Biotechnol*, **3**, 37-45.
- Drogen, F., O'Rourke, S. M., Stucke, V. M., Jaquenoud, M., Neiman, A. M. und Peter, M. (2000) Phosphorylation of the MEKK Ste11p by the PAK-like kinase Ste20p is required for MAP kinase signaling in vivo. *Curr Biol*, **10**, 630-639.

- Dürrenberger, F., Wong, K. und Kronstad, J. W. (1998) Identification of a cAMP-dependent protein kinase catalytic subunit required for virulence and morphogenesis in *Ustilago maydis*. *Proc Natl Acad Sci USA*, **95**, 5684-5689.
- Eddy, S. R. (1995) Multiple alignment using hidden Markov models. *Proc Int Conf Intell Syst Mol Biol*, **3**, 114-120.
- Elion, E. A. (2000) Pheromone response, mating and cell biology. *Curr Opin Microbiol*, **3**, 573-581.
- Elion, E. A., Satterberg, B. und Kranz, J. E. (1993) FUS3 phosphorylates multiple components of the mating signal transduction cascade: evidence for STE12 and FAR1. *Mol Biol Cell*, **4**, 495-510.
- Enslen, H., Branchio, D. M. und Davis, R. J. (2000) Molecular determinants that mediate selective activation of p38 MAP kinase isoforms. *EMBO J*, **19**, 1301-1311.
- Enslen, H. und Davis, R. J. (2001) Regulation of MAP kinases by docking domains. *Biol Cell*, **93**, 5-14.
- Errede, B. und Ammerer, G. (1989) STE12, a protein involved in cell-type-specific transcription and signal transduction in yeast, is part of protein-DNA complex. *Genes Dev*, **3**.
- Errede, B., Gartner, A., Zhou, Z., Nasmyth, K. und Ammerer, G. (1993) MAP kinase-related FUS3 from *S. cerevisiae* is activated by STE7 in vitro. *Nature*, **362**, 261-264.
- Estojak, J., Brent, R. und Golemis, E. A. (1995) Correlation of two-hybrid affinity data with in vitro measurements. *Mol Cell Biol*, **15**, 5820-5829.
- Fields, S. und Song, O. (1989) A novel genetic system to detect protein-protein interactions. *Nature*, **340**, 245-246.
- Froeliger, E. H. und Leong, S. A. (1991) The a mating-type alleles of *Ustilago maydis* are idiomorphs. *Gene*, **100**, 113-122.
- Fukuda, M., Gotoh, I., Adachi, M., Gotoh, Y. und Nishida, E. (1997) A novel regulatory mechanism in the mitogen-activated protein (MAP) kinase cascade. Role of nuclear export signal of MAP kinase kinase. *J Biol Chem*, **272**, 32642-32648.
- Fukuda, M., Gotoh, I., Gotoh, Y. und Nishida, E. (1996) Cytoplasmic localization of mitogen-activated protein kinase kinase directed by its NH<sub>2</sub>-terminal, leucine-rich short amino acid sequence, which acts as a nuclear export signal. *J Biol Chem*, **271**, 20024-20028.
- Gancedo, J. M. (2001) Control of pseudohyphae formation in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Microbiol Rev*, **25**, 107-123.
- Garrido, E. und Pérez-Martin, J. (2003) The *crk1* gene encodes an Ime2-related protein that is required for morphogenesis in the plant pathogen *Ustilago maydis*. *Mol Microbiol*, **47**, 729-743.
- Gartner, A., Nasmyth, K. und Ammerer, G. (1992) Signal transduction in *Saccharomyces cerevisiae* requires tyrosine and threonine phosphorylation of FUS3 and KSS1. *Genes Dev*, **6**, 1280-1292.
- Gilbert, M. S., Johnson, A. und Dean, R. (1996) Chemical signals responsible for appressorium formation in the rice blast fungus *Magnaporthe grisea*. *Physiol Mol Plant Pathol*, **48**, 335-346.
- Gillissen, B., Bergemann, J., Sandmann, C., Schröer, B., Bölker, M. und Kahmann, R. (1992) A two-component regulatory system for self/non-self recognition in *Ustilago maydis*. *Cell*, **68**, 647-657.
- Gold, S., Duncan, G., Barrett, K. und Kronstad, J. (1994) cAMP regulates morphogenesis in the fungal pathogen *Ustilago maydis*. *Genes Dev*, **8**, 2805-2816.
- Gold, S. E., Brogdon, S. M., Mayorga, M. E. und Kronstad, J. W. (1997) The *Ustilago maydis* regulatory subunit of a cAMP-dependent protein kinase is required for gall formation in maize. *Plant Cell*, **9**, 1585-1594.
- Gotoh, Y., Nishida, E., Shimanuki, M., Toda, T., Imai, Y. und Yamamoto, M. (1993) *Schizosaccharomyces pombe* Spk1 is a tyrosine-phosphorylated protein functionally related to *Xenopus* mitogen-activated protein kinase. *Mol Cell Biol*, **13**, 6427-6434.
- Guarro, J., Gene, J. und Stchigel, A. M. (1999) Developments in fungal taxonomy. *Clin Microbiol Rev*, **12**, 454-500.
- Gustin, M. C., Albertyn, J., Alexander, M. und Davenport, K. (1998) MAP kinase pathways in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiol Mol Biol Rev*, **62**, 1264-1300.

- Hagen, D. C., McCaffrey, G. und Sprague, G. F., Jr. (1991) Pheromone response elements are necessary and sufficient for basal and pheromone-induced transcription of the *FUS1* gene of *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol*, **11**, 2952-2961.
- Hanahan, D. (1985) Techniques for transformation in *E. coli*. In Rickwood, D. und Hames, B. D. (eds.), *DNA cloning, a practical approach*. IRL Press, Vol. 1, pp. 109-135.
- Hartmann, H. A. (1997) Die Pheromonantwort in *Ustilago maydis*: Kontrolle von Zellfusion und Pathogenität. *Fakultät für Biologie*. Ludwig-Maximilians-Universität, München.
- Hartmann, H. A., Kahmann, R. und Bölker, M. (1996) The pheromone response factor coordinates filamentous growth and pathogenicity in *Ustilago maydis*. *EMBO J.*, **15**, 1632-1641.
- Hartmann, H. A., Krüger, J., Lottspeich, F. und Kahmann, R. (1999) Environmental signals controlling sexual development of the corn smut fungus *Ustilago maydis* through the transcriptional regulator *prf1*. *Plant Cell*, **11**, 1293-1306.
- Heinisch, J. J., Lorberg, A., Schmitz, H. P. und Jacoby, J. J. (1999) The protein kinase C-mediated MAP kinase pathway involved in the maintenance of cellular integrity in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Microbiol*, **32**, 671-680.
- Heringa, J. (1999) Two strategies for sequence comparison: profile-preprocessed and secondary structure-induced multiple alignment. *Comput Chem*, **23**, 341-364.
- Herman, D. und Calderone, R. (2002) Pathogenic Development of *Candida albicans*. In Osiewacz, H. (ed.), *Molecular Biology of Fungal Development*, pp. 477-512.
- Hoch, H. C., Staples, R. C., Whitehead, B., Comeau, J. und Wolf, E. D. (1987) Signaling for growth orientation and cell differentiation by surface topography in *Uromyces*. *Science*, **235**, 1659-1662.
- Hoffman, C. S. und Winston, F. (1987) A ten-minute DNA preparation from yeast efficiently releases autonomous plasmids for transformation of *E. coli*. *Gene*, **57**, 267-272.
- Hohmann, S. (2002) Osmotic stress signaling and osmoadaptation in yeasts. *Microbiol Mol Biol Rev*, **66**, 300-372.
- Holliday, R. (1961) The genetics of *Ustilago maydis*. *Genet Res Camb*, **2**, 204-230.
- Holliday, R. (1974) *Ustilago maydis*. In King, R. C. (ed.), *Handbook of Genetics*. Plenum Press, New York, USA, Vol. 1, pp. 575-595.
- Hou, Z., Xue, C., Peng, Y., Katan, T., Kistler, H. C. und Xu, J. R. (2002) A mitogen-activated protein kinase gene (*MGVI*) in *Fusarium graminearum* is required for female fertility, heterokaryon formation, and plant infection. *Mol Plant Microbe Interact*, **15**, 1119-1127.
- Huang, W. und Erikson, R. L. (1994) Constitutive activation of Mek1 by mutation of serine phosphorylation sites. *Proc Natl Acad Sci USA*, **91**, 8960-8963.
- Hulder, G. W. (1998) *Magical Mushrooms, Mischievous Molds*. Princeton University Press, Princeton.
- Hull, C. M., Raisner, R. M. und Johnson, A. D. (2000) Evidence for mating of the "asexual" yeast *Candida albicans* in a mammalian host. *Science*, **289**, 307-310.
- Hull, C. M. und Johnson, A. D. (1999) Identification of a mating type-like locus in the asexual pathogenic yeast *Candida albicans*. *Science*, **285**, 1271-1275.
- Hunter, T. und Plowman, G. D. (1997) The protein kinases of budding yeast: six score and more. *Trends Biochem Sci*, **22**, 18-22.
- Innis, M. A., Gelfand, D. H., Sninsky, J. J. und White, T. J. (eds.) (1990) *PCR Protocols: a guide to methods and applications*. Academic Press, San Diego, USA.
- Jansen, G., Buhring, F., Hollenberg, C. P. und Ramezani Rad, M. (2001) Mutations in the SAM domain of STE50 differentially influence the MAPK- mediated pathways for mating, filamentous growth and osmotolerance in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Genet Genomics*, **265**, 102-117.
- Johnson, D. A., Akamine, P., Radzio-Andzelm, E., Madhusudan, M. und Taylor, S. S. (2001) Dynamics of cAMP-dependent protein kinase. *Chem Rev*, **101**, 2243-2270.
- Kahmann, R., Steinberg, G., Basse, C., Feldbrügge, M. und Kämper, J. (2000) *Ustilago maydis*, the causative agent of corn smut disease. In Kronstad, J. W. (ed.), *Fungal Pathology*, pp. 347-371. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht.

- Kahmann, R., Romeis, T., Bölker, M. und Kämper, J. (1995) Control of mating and development in *Ustilago maydis*. *Curr Opin Genet Dev*, **5**, 559-564.
- Kaiser, C., Michaelis, S. und Mitchell, A. (1994) *Methods in Yeast Genetics*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York.
- Kämper, J., Reichmann, M., Romeis, T., Bölker, M. und Kahmann, R. (1995) Multiallelic recognition: nonself-dependent dimerization of the bE and bW homeodomain proteins in *Ustilago maydis*. *Cell*, **81**, 73-83.
- Keon, J. P., White, G. A. und Hargreaves, J. A. (1991) Isolation, characterization and sequence of a gene conferring resistance to the systemic fungicide carboxin from the maize smut pathogen, *Ustilago maydis*. *Curr Genet*, **19**, 475-481.
- Khokhlatchev, A. V., Canagarajah, B., Wilsbacher, J., Robinson, M., Atkinson, M., Goldsmith, E. und Cobb, M. H. (1998) Phosphorylation of the MAP kinase ERK2 promotes its homodimerization and nuclear translocation. *Cell*, **93**, 605-615.
- Kim, Y. K., Kawano, T., Li, D. und Kolattukudy, P. E. (2000a) A mitogen-activated protein kinase kinase required for induction of cytokinesis and appressorium formation by host signals in the conidia of *Colletotrichum gloeosporioides*. *Plant Cell*, **12**, 1331-1343.
- Kim, Y. K., Liu, Z. M., Li, D. und Kolattukudy, P. E. (2000b) Two novel genes induced by hard-surface contact of *Colletotrichum gloeosporioides* conidia. *J Bacteriol*, **182**, 4688-4695.
- Kolattukudy, P. E., Rogers, L. M., Li, D., Hwang, C. S. und Flaishman, M. A. (1995) Surface signaling in pathogenesis. *Proc Natl Acad Sci USA*, **92**, 4080-4087.
- Kronstad, J. (1997) Virulence and cAMP in smuts, blasts and blights. *Trends Plant Sci.*, **2**, 193 - 199.
- Kronstad, J. W. und Leong, S. A. (1989) Isolation of two alleles of the *b* locus of *Ustilago maydis*. *Proc Natl Acad Sci USA*, **86**, 978-982.
- Kronstad, J. W. und Leong, S. A. (1990) The *b* mating-type locus of *Ustilago maydis* contains variable and constant regions. *Genes Dev*, **4**, 1384-1395.
- Krüger, J. (1999) Der cAMP-Weg und sein Einfluß auf Pheromonsignaltransduktion und Pathogenität in *Ustilago maydis*. *Fakultät für Biologie*. Ludwig-Maximilians-Universität, München.
- Krüger, J., Loubradou, G., Regenfelder, E., Hartmann, A. und Kahmann, R. (1998) Crosstalk between cAMP and pheromone signalling pathways in *Ustilago maydis*. *Mol Gen Genet*, **260**, 193-198.
- Krüger, J., Loubradou, G., Wanner, G., Regenfelder, E., Feldbrügge, M. und Kahmann, R. (2000) Activation of the cAMP pathway in *Ustilago maydis* reduces fungal proliferation and teliospore formation in plant tumors. *Mol Plant Microbe Interact*, **13**, 1034-1040.
- Kültz, D. (1998) Phylogenetic and functional classification of mitogen- and stress-activated protein kinases. *J Mol Evol*, **46**, 571-588.
- Laemmli, U. K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, **227**, 680-685.
- Leberer, E., Thomas, D. Y. und Whiteway, M. (1997) Pheromone signalling and polarized morphogenesis in yeast. *Curr Opin Genet Dev*, **7**, 59-66.
- Lee, N. und Kronstad, J. W. (2002) *ras2* controls morphogenesis, pheromone response, and pathogenicity in the fungal pathogen *Ustilago maydis*. *Eukaryot Cell*, **1**, 954-966.
- Lee, Y.-H. und Dean, R. (1994) Hydrophobicity of contact surface induces appressorium formation in *Magnaporthe grisea*. *FEMS Microbiol Lett*, **115**, 71-76.
- Lengeler, K. B., Davidson, R. C., D'Souza, C., Harashima, T., Shen, W. C., Wang, P., Pan, X., Waugh, M. und Heitman, J. (2000) Signal transduction cascades regulating fungal development and virulence. *Microbiol Mol Biol Rev*, **64**, 746-785.
- Lengeler, K. B., Fox, D. S., Fraser, J. A., Allen, A., Forrester, K., Dietrich, F. S. und Heitman, J. (2002) Mating-type locus of *Cryptococcus neoformans*: a step in the evolution of sex chromosomes. *Eukaryot Cell*, **1**, 704-718.
- Lengeler, K. B. und Heitman, J. (2002) *Cryptococcus neoformans* as a model fungal pathogen. In Osiewacz, H. (ed.), *Molecular Biology of Fungal Development*, pp. 513-558.

- Lim, S., Zou, Y. und Friedman, E. (2002) The transcriptional activator Mirk/Dyrk1B is sequestered by p38 $\alpha$ / $\beta$  MAP kinase. *J Biol Chem*, **277**, 49438-49445.
- Lo, H. J., Kohler, J. R., DiDomenico, B., Loebenberg, D., Cacciapuoti, A. und Fink, G. R. (1997) Nonfilamentous *C. albicans* mutants are avirulent. *Cell*, **90**, 939-949.
- Loubradou, G., Brachmann, A., Feldbrügge, M. und Kahmann, R. (2001) A homologue of the transcriptional repressor Ssn6p antagonizes cAMP signalling in *Ustilago maydis*. *Mol Microbiol*, **40**, 719-730.
- Macara, I. G. (2001) Transport into and out of the nucleus. *Microbiol Mol Biol Rev*, **65**, 570-594.
- Madhani, H. D. und Fink, G. R. (1997) Combinatorial control required for the specificity of yeast MAPK signaling. *Science*, **275**, 1314-1317.
- Madhani, H. D., Styles, C. A. und Fink, G. R. (1997) MAP kinases with distinct inhibitory functions impart signaling specificity during yeast differentiation. *Cell*, **91**, 673-684.
- Magee, B. B., Legrand, M., Alarco, A. M., Raymond, M. und Magee, P. T. (2002) Many of the genes required for mating in *Saccharomyces cerevisiae* are also required for mating in *Candida albicans*. *Mol Microbiol*, **46**, 1345-1351.
- Magee, B. B. und Magee, P. T. (2000) Induction of mating in *Candida albicans* by construction of *MTLa* and *MTLalpha* strains. *Science*, **289**, 310-313.
- Mansour, S. J., Candia, J. M., Matsuura, J. E., Manning, M. C. und Ahn, N. G. (1996) Interdependent domains controlling the enzymatic activity of mitogen-activated protein kinase kinase 1. *Biochemistry*, **35**, 15529-15536.
- Marck, C. (1988) 'DNA Strider': a 'C' program for the fast analysis of DNA and protein sequences on the Apple Macintosh family of computers. *Nucleic Acids Res*, **16**, 1829-1836.
- Marcus, S., Polverino, A., Barr, M. und Wigler, M. (1994) Complexes between STE5 and components of the pheromone-responsive mitogen-activated protein kinase module. *Proc Natl Acad Sci USA*, **91**, 7762-7766.
- Masuda, T., Kariya, K., Shinkai, M., Okada, T. und Kataoka, T. (1995) Protein kinase Byr2 is a target of Ras1 in the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*. *J Biol Chem*, **270**, 1979-1982.
- Mattingly, R. R. und Macara, I. G. (1996) Phosphorylation-dependent activation of the Ras-GRF/CDC25<sup>Mm</sup> exchange factor by muscarinic receptors and G-protein  $\beta\gamma$  subunits. *Nature*, **382**, 268-272.
- Mayorga, M. E. und Gold, S. E. (1998) Characterization and molecular genetic complementation of mutants affecting dimorphism in the fungus *Ustilago maydis*. *Fungal Genet Biol*, **24**, 364-376.
- Mayorga, M. E. und Gold, S. E. (1999) A MAP kinase encoded by the *ubc3* gene of *Ustilago maydis* is required for filamentous growth and full virulence. *Mol Microbiol*, **34**, 485-497.
- Mayorga, M. E. und Gold, S. E. (2001) The *ubc2* gene of *Ustilago maydis* encodes a putative novel adaptor protein required for filamentous growth, pheromone response and virulence. *Mol Microbiol*, **41**, 1365-1379.
- Miller, J. H. (1972) *Experiments in molecular genetics*. Cold Spring Harbor, New York.
- Mitchell, T. K. und Dean, R. A. (1995) The cAMP-dependent protein kinase catalytic subunit is required for appressorium formation and pathogenesis by the rice blast pathogen *Magnaporthe grisea*. *Plant Cell*, **7**, 1869-1878.
- Müller, E. und Loeffler, W. (1992) *Mykologie*. Thieme Verlag, Stuttgart, New York.
- Müller, P., Aichinger, C., Feldbrügge, M. und Kahmann, R. (1999) The MAP kinase Kpp2 regulates mating and pathogenic development in *Ustilago maydis*. *Mol Microbiol*, **34**, 1007-1017.
- Müller, P., Katzenberger, J. D., Loubradou, G. und Kahmann, R. (2003a) The Guanyl Nucleotide Exchange Factor Ssl2 and Ras2 regulate filamentous growth in *Ustilago maydis*. *Eukaryot Cell*, Im Druck.
- Müller, P., Leibbrandt, A., Cubasch, S., Teunissen, H., Aichinger, C. und Kahmann, R. (2003b) The G $\beta$ -subunit encoding gene *bpp1* controls cAMP signalling in *Ustilago maydis*. Eingereicht.
- Nagata, Y. und Burger, M. M. (1974) Wheat germ agglutinin. Molecular characteristics and specificity for sugar binding. *J Biol Chem*, **249**, 3116-3122.
- Nakafuku, M., Obara, T., Kaibuchi, K., Miyajima, I., Miyajima, A., Itoh, H., Nakamura, S., Arai, K., Matsumoto, K. und Kaziro, Y. (1988) Isolation of a second yeast *Saccharomyces cerevisiae* gene (GPA2)

- coding for guanine nucleotide-binding regulatory protein: studies on its structure and possible functions. *Proc Natl Acad Sci USA*, **85**, 1374-1378.
- Nakai, K. und Horton, P. (1999) PSORT: a program for detecting sorting signals in proteins and predicting their subcellular localization. *Trends Biochem Sci*, **24**, 34-36.
- Nakai, K. und Kanehisa, M. (1992) A knowledge base for predicting protein localization sites in eukaryotic cells. *Genomics*, **14**, 897-911.
- Nassar, N., Horn, G., Herrmann, C., Block, C., Janknecht, R. und Wittinghofer, A. (1996) Ras/Rap effector specificity determined by charge reversal. *Nat Struct Biol*, **3**, 723-729.
- Nassar, N., Horn, G., Herrmann, C., Scherer, A., McCormick, F. und Wittinghofer, A. (1995) The 2.2 Å crystal structure of the Ras-binding domain of the serine/threonine kinase c-Raf1 in complex with Rap1A and a GTP analogue. *Nature*, **375**, 554-560.
- Neiman, A. M. und Herskowitz, I. (1994) Reconstitution of a yeast protein kinase cascade in vitro: activation of the yeast MEK homologue STE7 by STE11. *Proc Natl Acad Sci USA*, **91**, 3398-3402.
- Neiman, A. M., Stevenson, B. J., Xu, H. P., Sprague, G. F., Jr., Herskowitz, I., Wigler, M. und Marcus, S. (1993) Functional homology of protein kinases required for sexual differentiation in *Schizosaccharomyces pombe* and *Saccharomyces cerevisiae* suggests a conserved signal transduction module in eukaryotic organisms. *Mol Biol Cell*, **4**, 107-120.
- Nguyen, A. N., Ikner, A. D., Shiozaki, M., Warren, A. M. und Shiozaki, K. (2002) Cytoplasmatische localization of Wis1 MAPKK by nuclear export signal is important for nuclear targeting of Spc1/Sty1 MAPK in fission yeast. *Mol Biol Cell*, **13**, 2651-2663.
- Nielsen, H., Engelbrecht, J., Brunak, S. und von Heijne, G. (1997a) Identification of prokaryotic and eukaryotic signal peptides and prediction of their cleavage sites. *Protein Eng*, **10**, 1-6.
- Nielsen, H., Engelbrecht, J., Brunak, S. und von Heijne, G. (1997b) A neural network method for identification of prokaryotic and eukaryotic signal peptides and prediction of their cleavage sites. *Int J Neural Syst*, **8**, 581-599.
- Nomoto, S., Nakayama, N., Arai, K. und Matsumoto, K. (1990) Regulation of the yeast pheromone response pathway by G protein subunits. *EMBO J*, **9**, 691-696.
- Oehlen, L. J., McKinney, J. D. und Cross, F. R. (1996) Ste12 and Mcm1 regulate cell cycle-dependent transcription of *FAR1*. *Mol Cell Biol*, **16**, 2830-2837.
- Orth, A. B., Rzhetskaya, M., Pell, E. J. und Tien, M. (1995) A serine (threonine) protein kinase confers fungicide resistance in the phytopathogenic fungus *Ustilago maydis*. *Appl Environ Microbiol*, **61**, 2341-2345.
- Pak, Y., Pham, N. und Rotin, D. (2002) Direct binding of the beta1 adrenergic receptor to the cyclic AMP-dependent guanine nucleotide exchange factor CNrasGEF leads to Ras activation. *Mol Cell Biol*, **22**, 7942-7952.
- Palecek, S. P., Parikh, A. S. und Kron, S. J. (2002) Sensing, signalling and integrating physical processes during *Saccharomyces cerevisiae* invasive and filamentous growth. *Microbiology*, **148**, 893-907.
- Pan, X., Harashima, T. und Heitman, J. (2000) Signal transduction cascades regulating pseudohyphal differentiation of *Saccharomyces cerevisiae*. *Curr Opin Microbiol*, **3**, 567-572.
- Papasavvas, S., Arkinstall, S., Reid, J. und Payton, M. (1992) Yeast alpha-mating factor receptor and G-protein-linked adenyl cyclase inhibition requires RAS2 and GPA2 activities. *Biochem Biophys Res Commun*, **184**, 1378-1385.
- Park, G., Xue, C., Zheng, L., Lam, S. und Xu, J. R. (2002) *MST12* regulates infectious growth but not appressorium formation in the rice blast fungus *Magnaporthe grisea*. *Mol Plant Microbe Interact*, **15**, 183-192.
- Payne, D. M., Rossomando, A. J., Martino, P., Erickson, A. K., Her, J. H., Shabanowitz, J., Hunt, D. F., Weber, M. J. und Sturgill, T. W. (1991) Identification of the regulatory phosphorylation sites in pp42/mitogen-activated protein kinase (MAP kinase). *EMBO J*, **10**, 885-892.

- Pearson, G., Robinson, F., Gibson, B. T., Xu, B. E., Karandikar, M., Berman, K. und Cobb, M. H. (2001) Mitogen-activated protein (MAP) kinase pathways: regulation and physiological functions. *Endocr Rev*, **22**, 153-183.
- Peterson, A. J., Kyba, M., Bornemann, D., Morgan, K., Brock, H. W. und Simon, J. (1997) A domain shared by the Polycomb group proteins Scm and ph mediates heterotypic and homotypic interactions. *Mol Cell Biol*, **17**, 6683-6692.
- Podila, G. K., Rogers, L. M. und Kolattukudy, P. E. (1993) Chemical signals from avocado surface wax trigger germination and appressorium formation in *Colletotrichum gloeosporioides*. *Plant Physiol*, **103**, 267 - 272.
- Ponting, C. P. (1995) SAM: a novel motif in yeast sterile and Drosophila polyhomeotic proteins. *Protein Sci*, **4**, 1928-1930.
- Ponting, C. P. und Benjamin, D. R. (1996) A novel family of Ras-binding domains. *Trends Biochem Sci*, **21**, 422-425.
- Printen, J. A. und Sprague, G. F., Jr. (1994) Protein-protein interactions in the yeast pheromone response pathway: Ste5p interacts with all members of the MAP kinase cascade. *Genetics*, **138**, 609-619.
- Puhalla, J. E. (1968) Compatibility reactions on solid medium and interstrain inhibition in *Ustilago maydis*. *Genetics*, **60**, 461-474.
- Ramachander, R., Kim, C. A., Phillips, M. L., Mackereth, C. D., D., T., McIntosh, L. P. und Bowie, J. U. (2002) Oligomerization-dependent association of the SAM domains from *Schizosaccharomyces pombe* Byr2 and Ste4. *J Biol Chem*, **277**, 39585-39593.
- Rechsteiner, M. und Rogers, S. W. (1996) PEST sequences and regulation by proteolysis. *Trends Biochem Sci*, **21**, 267-271.
- Regenfelder, E., Spellig, T., Hartmann, A., Lauenstein, S., Bölker, M. und Kahmann, R. (1997) G proteins in *Ustilago maydis*: Transmission of multiple signals? *EMBO Journal*, **16**, 1934-1942.
- Reiser, V., Ammerer, G. und Ruis, H. (1999) Nucleocytoplasmic traffic of MAP kinases. *Gene Expr*, **7**, 247-254.
- Rhodes, N., Connell, L. und Errede, B. (1990) STE11 is a protein kinase required for cell-type-specific transcription and signal transduction in yeast. *Genes Dev*, **4**, 1862-1874.
- Robbins, D. J., Zhen, E., Owaki, H., Vanderbilt, C. A., Ebert, D., Geppert, T. D. und Cobb, M. H. (1993) Regulation and properties of extracellular signal-regulated protein kinases 1 and 2 in vitro. *J Biol Chem*, **268**, 5097-5106.
- Roberts, C. J., Nelson, B., Marton, M. J., Stoughton, R., Meyer, M. R., Bennett, H. A., He, Y. D., Dai, H., Walker, W. L., Hughes, T. R., Tyers, M., Boone, C. und Friend, S. H. (2000) Signaling and circuitry of multiple MAPK pathways revealed by a matrix of global gene expression profiles. *Science*, **287**, 873-880.
- Robinson, F. L., Whitehurst, A. W., Raman, M. und Cobb, M. H. (2002) Identification of novel point mutations in ERK2 that selectively disrupt binding to MEK1. *J Biol Chem*, **277**, 14844-14852.
- Rocha, C. R., Schroppel, K., Harcus, D., Marcil, A., Dignard, D., Taylor, B. N., Thomas, D. Y., Whiteway, M. und Leberer, E. (2001) Signaling through adenylyl cyclase is essential for hyphal growth and virulence in the pathogenic fungus *Candida albicans*. *Mol Biol Cell*, **12**, 3631-3643.
- Rogers, S., Wells, R. und Rechsteiner, M. (1986) Amino acid sequences common to rapidly degraded proteins: the PEST hypothesis. *Science*, **234**, 364-368.
- Romeis, T., Brachmann, A., Kahmann, R. und Kämper, J. (2000) Identification of a target gene for the bE/bW homeodomain protein complex in *Ustilago maydis*. *Mol Microbiol*, **37**, 54-66.
- Rowell, J. B. (1955) Functional role of compatibility factors and an *in vitro* test for sexual incompatibility with haploid lines of *Ustilago zea*. *Phytopathology*, **45**, 370-374.
- Rowell, J. B. und DeVay, J. E. (1954) Genetics of *Ustilago zea* in relation to basic problems of its pathogenicity. *Phytopathology*, **44**, 356-362.
- Rupp, S., Summers, E., Lo, H.-J., Madhani, H. und Fink, G. (1999) MAP kinase and cAMP filamentation signaling pathways converge on the unusually large promoter of the yeast *FLO11* gene. *EMBO J*, **18**, 1257-1269.
- Sambrook, J., Frisch, E. F. und Maniatis, T. (1989) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbour Laboratory Press, Cold Spring Harbour, New York.

- Sanger, F., Nicklen, S. und Coulson, A. R. (1977) DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci USA*, **74**, 5463-5467.
- Schäfer, W. (1994) Molecular mechanisms of fungal pathogenicity to plants. *Annu Rev Phytopathol*, **32**, 461-477.
- Schauwecker, F., Wanner, G. und Kahmann, R. (1995) Filament-specific expression of a cellulase gene in the dimorphic fungus *Ustilago maydis*. *Biol Chem Hoppe-Seyler*, **376**, 617-625.
- Scheffzek, K., Grunewald, P., Wohlgemuth, S., Kabsch, W., Tu, H., Wigler, M., Wittinghofer, A. und Herrmann, C. (2001) The Ras-Byr2RBD complex: structural basis for Ras effector recognition in yeast. *Structure (Camb)*, **9**, 1043-1050.
- Schmitt, M. E., Brown, T. A. und Trumpower, B. L. (1990) A rapid and simple method for preparation of RNA from *Saccharomyces cerevisiae*. *Nucleic Acids Res*, **18**, 3091-3092.
- Schultz, J., Copley, R. R., Doerks, T., Ponting, C. P. und Bork, P. (2000) SMART: a web-based tool for the study of genetically mobile domains. *Nucleic Acids Res*, **28**, 231-234.
- Schultz, J., Milpetz, F., Bork, P. und Ponting, C. P. (1998) SMART, a simple modular architecture research tool: identification of signaling domains. *Proc Natl Acad Sci USA*, **95**, 5857-5864.
- Schultz, J., Ponting, C. P., Hofmann, K. und Bork, P. (1997) SAM as a protein interaction domain involved in developmental regulation. *Protein Sci*, **6**, 249-253.
- Schulz, B., Banuett, F., Dahl, M., Schlesinger, R., Schäfer, W., Martin, T., Herskowitz, I. und Kahmann, R. (1990) The *b* alleles of *U. maydis*, whose combinations program pathogenic development, code for polypeptides containing a homeodomain-related motif. *Cell*, **60**, 295-306.
- Sharrocks, A. D., Yang, S.-H. und Galanis, A. (2000) Docking domains and substrate-specificity determination for MAP kinases. *Trends Biochem Sci*, **25**, 448-453.
- Sherman, F., Fink, G. und Hicks, J. B. (1996) *Laboratory course for methods in yeast genetics*. Cold Spring Harbour Laboratory Press, Cold Spring Harbour, New York.
- Smith, D., Yu, Z., Gold, S. und Perlin, M. H. (2003) Smu1, a Ste20p homologue from *Ustilago maydis* with roles in mating and pathogenicity. *22nd Fungal Genetics Conference (Asilomar Conference Center)*, Pacific Grove, CA, USA.
- Snetselaar, K. M. (1993) Microscopic observation of *Ustilago maydis* mating interactions. *Exp Mycology*, **17**, 345-355.
- Snetselaar, K. M., Bölker, M. und Kahmann, R. (1996) *Ustilago maydis* mating hyphae orient their growth toward pheromone sources. *Fungal Genet Biol*, **20**, 299-312.
- Snetselaar, K. M. und Mims, C. W. (1992) Sporidial fusion and infection of maize seedlings by the smut fungus *Ustilago maydis*. *Mycologia*, **84**, 193-203.
- Snetselaar, K. M. und Mims, C. W. (1993) Infection of maize stigmas by *Ustilago maydis*: Light and electron microscopy. *Phytopathology*, **83**, 843.
- Snetselaar, K. M. und Mims, C. W. (1994) Light and electron microscopy of *Ustilago maydis* hyphae in maize. *Mycol Res*, **98**, 347-355.
- Sonneborn, A., Bockmuhl, D. P., Gerads, M., Kurpanek, K., Sanglard, D. und Ernst, J. F. (2000) Protein kinase A encoded by TPK2 regulates dimorphism of *Candida albicans*. *Mol Microbiol*, **35**, 386-396.
- Southern, E. M. (1975) Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *J Mol Biol*, **98**, 503-517.
- Spellig, T., Bölker, M., Lottspeich, F., Frank, R. W. und Kahmann, R. (1994) Pheromones trigger filamentous growth in *Ustilago maydis*. *EMBO J.*, **13**, 1620-1627.
- Spellig, T., Bottin, A. und Kahmann, R. (1996) Green fluorescent protein (GFP) as a new vital marker in the phytopathogenic fungus *Ustilago maydis*. *Mol Gen Genet*, **252**, 503-509.
- Sprang, S. R. (1997) G Protein mechanisms: Insights from structural analysis. *Ann Rev Biochem*, **66**, 639-678.
- Steinberg, G., Schliwa, M., Lehmler, C., Bölker, M., Kahmann, R. und McIntosh, J. R. (1998) Kinesin from the plant pathogenic fungus *Ustilago maydis* is involved in vacuole formation and cytoplasmic migration. *J Cell Sci*, **111**, 2235-2246.



- Stevenson, B. J., Rhodes, N., Errede, B. und Sprague, G. F., Jr. (1992) Constitutive mutants of the protein kinase STE11 activate the yeast pheromone response pathway in the absence of the G protein. *Genes Dev*, **6**, 1293-1304.
- Takano, Y., Kikuchi, T., Kubo, Y., Hamer, J. E., Mise, K. und Furusawa, I. (2000) The *Colletotrichum lagenarium* MAP kinase gene *CMK1* regulates diverse aspects of fungal pathogenesis. *Mol Plant Microbe Interact*, **13**, 374-383.
- Takano, Y., Komeda, K., Kojima, K. und Okuno, T. (2001) Proper regulation of cyclic AMP-dependent protein kinase is required for growth, conidiation, and appressorium function in the anthracnose fungus *Colletotrichum lagenarium*. *Mol Plant Microbe Interact*, **14**, 1149-1157.
- Tanoue, T., Adachi, M., Moriguchi, T. und Nishida, E. (2000) A conserved docking motif in MAP kinases common to substrates, activators and regulators. *Nat Cell Biol*, **2**, 110-116.
- Tanoue, T., Maeda, R., Adachi, M. und Nishida, E. (2001) Identification of a docking groove on ERK and p38 MAP kinases that regulates the specificity of docking interactions. *EMBO J*, **20**, 466-479.
- Taylor, S. S. und Buechler, J. A. (1990) cAMP-dependent protein kinase: framework for a diverse family of regulatory enzymes. *Ann Rev Biochem*, **59**, 971-1005.
- Thevelein, J. M., Cauwenberg, L., Colombo, S., De Winde, J. H., Donation, M., Dumortier, F., Kraakman, L., Lemaire, K., Ma, P., Nauwelaers, D., Rolland, F., Teunissen, A., Van Dijck, P., Versele, M., Wera, S. und Winderickx, J. (2000) Nutrient-induced signal transduction through the protein kinase A pathway and its role in the control of metabolism, stress resistance, and growth in yeast. *Enzyme Microb Technol*, **26**, 819-825.
- Thevelein, J. M. und de Winde, J. H. (1999) Novel sensing mechanisms and targets for the cAMP-protein kinase A pathway in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Microbiol*, **33**, 904-918.
- Thompson, J. D., Higgins, D. G. und Gibson, T. J. (1994) CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res*, **22**, 4673-4680.
- Timberlake, W. E. (1986) Isolation of stage- and cell-specific genes from fungi. In Bailey, J. (ed.) *Biology and Molecular Biology of Plant-Pathogen Interactions*, pp. 343-357. Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, Vol. H1.
- Toda, T., Uno, I., Ishikawa, T., Powers, S., Kataoka, T., Broek, D., Cameron, S., Broach, J., Matsumoto, K. und Wigler, M. (1985) In yeast, RAS proteins are controlling elements of adenylate cyclase. *Cell*, **40**, 27-36.
- Tsukuda, T., Carleton, S., Fotheringham, S. und Holloman, W. K. (1988) Isolation and characterization of an autonomously replicating sequence from *Ustilago maydis*. *Mol Cell Biol*, **8**, 3703-3709.
- Tu, H., Barr, M., Dong, D. L. und Wigler, M. (1997) Multiple regulatory domains on the Byr2 protein kinase. *Mol Cell Biol*, **17**, 5876-5887.
- Tucker, S. L. und Talbot, N. J. (2001) Surface attachment and pre-penetration stage development by plant pathogenic fungi. *Annu Rev Phytopathol*, **39**, 385-417.
- Urban, M., Kahmann, R. und Bölker, M. (1996a) The biallelic *a* mating type locus of *Ustilago maydis*: remnants of an additional pheromone gene indicate evolution from a multiallelic ancestor. *Mol Gen Genet*, **250**, 414-420.
- Urban, M., Kahmann, R. und Bölker, M. (1996b) Identification of the pheromone response element in *Ustilago maydis*. *Mol Gen Genet*, **251**, 31-37.
- Valtz, N., Peter, M. und Herskowitz, I. (1995) *FAR1* is required for oriented polarization of yeast cells in response to mating pheromones. *J Cell Biol*, **131**, 863-873.
- van Drogen, F. und Peter, M. (2001) MAP kinase dynamics in yeast. *Biol Cell*, **93**, 63-70.
- Versele, M., Lemaire, K. und Thevelein, J. M. (2001) Sex and sugar in yeast: two distinct GPCR systems. *EMBO Rep*, **2**, 574-579.
- Wang, Y., Xu, H. P., Riggs, M., Rodgers, L. und Wigler, M. (1991) *byr2*, a *Schizosaccharomyces pombe* gene encoding a protein kinase capable of partial suppression of the *ras1* mutant phenotype. *Mol Cell Biol*, **11**, 3554-3563.
- Weber, H. (1993) *Allgemeine Mykologie*. Gustav Fischer Verlag, Jena, Stuttgart.

- Wei, H., Requena, N. und Fischer, R. (2003) The MAPKK kinase SteC regulates conidiophore morphology and is essential for heterokaryon formation and sexual development in the homothallic fungus *Aspergillus nidulans*. *Mol Microbiol*, **47**, 1577-1588.
- Weinzierl, G. (2001) Isolierung und Charakterisierung der b-vermittelten Regulationskaskade in *Ustilao maydis*. *Fachbereich Biologie*. Philipps-Universität, Marburg.
- White, D. G. (1999) *Compendium of Corn Diseases*. APS Press, St. Paul.
- Widmann, C., Gibson, S., Jarpe, M. B. und Johnson, G. L. (1999) Mitogen-activated protein kinase: conservation of a three-kinase module from yeast to human. *Physiol Rev*, **79**, 143-180.
- Wilsbacher, J. L., Goldsmith, E. J. und Cobb, M. H. (1999) Phosphorylation of MAP kinases by MAPK/ERK kinases involves multiple regions of the MAP kinase. *J Biol Chem*, **274**.
- Wiseman, R. W., Stowers, S. J., Miller, E. C., Anderson, M. W. und Miller, J. A. (1986) Activating mutations of the c-Ha-ras protooncogene in chemically induced hepatomas of the male B6C3 F1 mouse. *Proc Natl Acad Sci USA*, **83**, 5825-5829.
- Wu C, Leberer E, Thomas DY, Whiteway M. (1999) Functional characterization of the interaction of Ste50p with Ste11p MAPKKK in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Biol Cell*, **10**, 2425-2440.
- Xu, B., Stippec, S., Robinson, F. L. und Cobb, M. H. (2001) Hydrophobic as well as charged residues in both MEK1 and ERK2 are important for their proper docking. *J Biol Chem*, **276**, 26509-26515.
- Xu, H. P., White, M., Marcus, S. und Wigler, M. (1994) Concerted action of RAS and G proteins in the sexual response pathways of *Schizosaccharomyces pombe*. *Mol Cell Biol*, **14**, 50-58.
- Xu, J. R. (2000) MAP kinases in fungal pathogens. *Fungal Genet Biol*, **31**, 137-152.
- Xu, J. R. und Hamer, J. E. (1996) MAP kinase and cAMP signaling regulate infection structure formation and pathogenic growth in the rice blast fungus *Magnaporthe grisea*. *Genes Dev*, **10**, 2696-2706.
- Xu, J. R., Staiger, C. J. und Hamer, J. E. (1998) Inactivation of the mitogen-activated protein kinase Mps1 from the rice blast fungus prevents penetration of host cells but allows activation of plant defense responses. *Proc Natl Acad Sci USA*, **95**, 12713-12718.
- Yang, Z. und Dickman, M. B. (1999) *Colletotrichum trifolii* mutants disrupted in the catalytic subunit of cAMP-dependent protein kinase are nonpathogenic. *Mol Plant Microbe Interact*, **12**, 430-439.
- Yuan, Y. O., Stroke, I. L. und Fields, S. (1991) Properties of the DNA-binding domain of the *Saccharomyces cerevisiae* Ste12 protein. *Mol Biol Cell*, **11**, 5910-5918.
- Zheng, C. F. und Guan, K. L. (1994) Activation of MEK family kinases requires phosphorylation of two conserved Ser/Thr residues. *EMBO J*, **13**, 1123-1131.
- Zheng, L., Campbell, M., Murphy, J., Lam, S. und Xu, J. R. (2000) The *BMP1* gene is essential for pathogenicity in the gray mold fungus *Botrytis cinerea*. *Mol Plant Microbe Interact*, **13**, 724-732.
- Zhou, Z., Gartner, A., Cade, R., Ammerer, G. und Errede, B. (1993) Pheromone-induced signal transduction in *Saccharomyces cerevisiae* requires the sequential function of three protein kinases. *Mol Cell Biol*, **13**, 2069-2080.

## Danksagung

Zum Abschluss möchte ich mich noch bei all denen bedanken, die mich die letzten Jahre wissenschaftlich begleitet haben und ohne die diese Arbeit nicht in dieser Form vorliegen würde.

Regine Kahmann gilt mein Dank, für die Möglichkeit, diese Arbeit anzufertigen, für die stete Förderung, für die Korrektur der schriftlichen Arbeit, und vor allem für die Freiheit, meine Ideen zu verfolgen.

Für die Übernahme der Zweitkorrektur möchte ich Michael Bölker danken, dessen Diskussionsbereitschaft und Offenheit für mich immer eine große Bereicherung waren. In dem Zusammenhang geht mein Dank auch an R. Fischer und R. Renkawitz-Pohl für die freundliche Bereitschaft, der Promotionskommission anzugehören.

Für Diskussionen, Materialien, Beistand, Freundschaft und eine gute Zeit danke ich Christian, Gerhard, Andreas, Feldi; ohne euch wäre es nicht gegangen. Jörg, Olli, Alex, Jan, Thomas, Mic, Siegi und Julia, danke für die Zeit und Hilfe. Für tatkräftige Unterstützung bei Projekten möchte ich Johannes, Karl-Heinz, Petra und Nicole danken. Für die fundierte Beratung in Sachen Biochemie, sei Christian K., Helle U. und Robert S. mein Dank ausgesprochen. Den Studenten, Andreas, Stephanie, Ute und Connie, die ich Betreuen und Anleiten durfte, ein Dankeschön; ich habe viel von und durch euch gelernt. Außerdem will ich denen sehr herzlich danken, die diese Arbeit durchgelesen und korrigiert haben, und damit viele Fehler eliminiert haben: Anja, Jan und Thomas. Danke, und ich hoffe, es hat euch allen auch Spaß gemacht.



## Lebenslauf

<b>Personalien</b>		Philip Sebastian Müller geboren am 14. April 1973 in Heidelberg
<b>Schulbildung</b>	1979-1983	Besuch der Mönchhof Grundschule, Heidelberg
	1983-1992	Besuch des Kurfürst-Friedrich-Gymnasiums, Heidelberg Abschluss: Abitur mit Gesamtnote 1,8
<b>Studium</b>	1992-1994	Studium der Biologie an der Ruprecht-Karls-Universität Heidelberg Abschluss: Vordiplom der Biologie Gesamtnote 2,0
	1994-1998	Studium der Biologie an der Ludwig-Maximilian-Universität München. Hauptfach: Genetik; Nebenfächer: Biochemie, Immunologie, Mikrobiologie Abschluss: Diplom in Biologie Gesamtnote 1,0
	07/1997-05/1998	Diplomarbeit am Institut für Genetik und Mikrobiologie der Ludwig-Maximilian-Universität München, Betreuer: Prof. Dr. R. Kahmann Thema: „Signaltransduktion in <i>Ustilago maydis</i> : Isolierung und Charakterisierung von MAPK-Kaskade Komponenten"
<b>Promotion</b>	11/1998-08/2000	Doktorarbeit am Institut für Genetik und Mikrobiologie der Ludwig-Maximilian-Universität München, Betreuer: Prof. Dr. R. Kahmann
	09/2000-08/2002	Doktorarbeit am Max-Planck-Institut für terrestrische Mikrobiologie Marburg, Betreuer: Prof. Dr. R. Kahmann Thema: „Signalweiterleitung in <i>Ustilago maydis</i> : Die Kpp4/Fuz7/Kpp2-MAPK-Kaskade kontrolliert Pheromonantwort und pathogene Entwicklung"